



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Utilidad de un puntaje de riesgo
genético basado en 10 SNPs para
predecir el inicio de diabetes tipo 2
en pacientes pediátricos

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A:

Dr. Daniel Benjamín Juárez
Comboni

TUTORES:

Dra. América Liliana Miranda Lora

Dr. Miguel Klünder Klünder



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



HOJA DE FIRMAS

**DR. SARBELIO MORENO ESPINOSA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**DRA. AMÉRICA MIRANDA LORA
TUTORA DE TESIS
INVERTIGADORA EN CIENCIAS MÉDICAS C
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE MEDICINA BASADA EN EVIDENCIAS
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**DR. MIGUEL KLÜNDER KLÜNDER
TUTOR DE TESIS
SUBDIRECTOR DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**



Dedicatoria

Quiero agradecer a mis padres, por siempre confiar en mí, por tener un apoyo y amor incondicional e infinito, por ser un gran motor en mi desarrollo como persona y ahora como profesional.

Agradezco a mis hermanos, por su apoyo, ayuda en cada momento que lo necesitaba, sin ellos, sin su inspiración, guía y ejemplo nada de esto hubiera sido posible.

Agradezco a mi novia Paola López Pérez, quien con cariño y sin dudar, fue mi equipo, que estuvo conmigo cada momento difícil y complicado, siendo mi apoyo y lugar de paz, así como mi compañía en los momentos alegres y triunfos que se dieron gracias a que estuvo y sigue a mi lado.

También agradezco a mi primo Julian Cisneros quien fue un hermano en este camino, siendo más que una distracción y apoyo cuando lo necesité.

A Raul y Nallely quienes a pesar de la distancia siempre fuimos muy unidos quienes nos hemos apoyado cruzando fronteras.

A mis hermanos de otra madre Ethan, Daniel, Juan José, Massimo, Ernesto y Sebastian quienes después de tantos años de amistad, siempre han estado presentes en los éxitos y caídas, quienes me han dado más que una mano y fuerza en la adversidad.

Quisiera agradecerles a mis amigos Rogelio, Salomón, Ximena, Maximiliano, Alejandro y Emerson quienes siempre fueron parte de mi vida y como apoyo ante muchas situaciones más que difíciles y parte de varios de los triunfos que pasaron y están por venir.

Finalmente, y muy importante, agradezco a mi tutora la Dra. América Miranda Lora, quien me brindó su paciencia, esfuerzo y conocimientos a lo largo de todo este tiempo para poder culminar este trabajo.

Contenido

Resumen.....	1
Marco Teórico.....	2
Factores de riesgo para DT2	2
Factores de riesgo ambiental	3
Factores de riesgo genético.....	3
Antecedentes	5
Planteamiento del problema.....	8
Pregunta de investigación	8
Justificación	8
Objetivos	9
General	9
Específicos	9
Hipótesis.....	9
Métodos.....	9
Diseño del estudio	9
Población de estudio	10
Procedimientos.....	11
Mediciones antropométricas y bioquímicas	11
Hábitos de alimentación y actividad física	12
Prueba de condición física (Harvard).....	13
SNPs y Genotipificación	13
Puntaje de riesgo genético (GRS)	14
Formación de recursos humanos	14
Tamaño de muestra.....	14
Análisis estadístico.....	14
Resultados	15
Discusión.....	19
Limitaciones del estudio	23
Cronograma de actividades	24
Anexos	25
Anexo 1. Definición de variables	25
Anexo 2. Carta de consentimiento informado	27

Anexo 3. Carta de asentimiento	29
Anexo 4. Consentimiento informado para la realización de estudio genético.	30
Anexo 5. Formato de Identificación y antecedentes.....	32
Anexo 6. Exploración física y prueba de Harvard.....	36
Anexo 7. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.	37
Anexo 8. Cuestionario de actividad física.....	41
Anexo 9. Artículo publicado	42
Bibliografía	50

Resumen

Antecedente. El aumento en la prevalencia e incidencia de Diabetes Mellitus tipo 2 (DT2) en todos los grupos de edad de nuestra población, aunado al elevado costo del tratamiento de la enfermedad y sus comorbilidades, conlleva a la necesidad de crear modelos de predicción diagnóstica y preventiva desde estadios tempranos de la vida.

Objetivo. Evaluar si un puntaje de riesgo genético (GRS) con 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a DT2 mejora la predicción de riesgo de la enfermedad de inicio en la edad pediátrica en niños y adolescentes mexicanos.

Metodología. Estudio de casos y controles. Se incluyeron 97 pacientes con diagnóstico reciente de DT2 (menos de un mes), con inicio de la enfermedad antes de los 18 años. Adicionalmente se estudiaron 84 controles de base poblacional sin diagnóstico de diabetes. Se obtuvo información sobre historia familiar de DT2, variables demográficas, factores de riesgo perinatal, así como de hábitos de alimentación y actividad física. Adicionalmente se realizaron mediciones antropométricas, bioquímicas y de condición física. Se realizó la genotipificación de 10 SNPs previamente asociados con DT2 de inicio en la edad pediátrica en nuestra población y se calculó una puntuación de riesgo genético con la suma de los alelos de riesgo. Se realizó un modelo de regresión logística multivariado para evaluar el riesgo de DT2 de inicio en la edad pediátrica, así como un análisis de curvas ROC para evaluar la predicción de DT2.

Resultados. El puntaje Z del índice de masa corporal (Z-IMC) y el antecedente de DT2 en la madre se asociaron a DT2 de inicio en la edad pediátrica (OR=1.7, $p=0.009$ y OR=7.1, $p<0.001$ respectivamente). No se identificaron otros factores de riesgo clínicos asociados. Se encontró una asociación significativa entre el GRS y el inicio de DT2 en edad pediátrica (OR=1.3 por alelo de riesgo, $p=0.006$). El GRS, los factores de riesgo clínico y el GRS más los factores de riesgo clínico tuvieron un área bajo la curva de 0.66 (IC 95% 0.56-0.75), 0.72 (IC 95% 0.62-0.81) y 0.78 (IC 95% 0.70-0.87) respectivamente ($p<0.01$).

Conclusiones: El GRS basado en 10 SNPs se asoció con DT2 de inicio en la edad pediátrica en nuestra población y mejora los modelos de predicción de forma modesta. Sin embargo, los factores clínicos como el Z-IMC y la historia familiar de DT2 continúan siendo los factores de mayor utilidad predictiva en nuestra población.

Marco Teórico

La prevalencia de obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (DT2) han incrementado en todo el mundo. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud en México, el 10.3% de la población tienen diabetes mellitus^{[1],[2]} y la DT2 es la forma más frecuente.^[3] Esta enfermedad está afectando con mayor frecuencia a población de menor edad, identificándose presentaciones tempranas (antes de los 45)^[4] e incluso presentaciones que podrían considerarse “ultra tempranas” en la edad pediátrica (antes de los 19 años).^[5]

La DT2 se caracteriza por un mecanismo dual de disfunción de las células β del páncreas y resistencia a la insulina en los órganos diana.^[6] Es una enfermedad de origen multifactorial en la que interactúan factores genéticos y ambientales. Aunque los principales factores ambientales, como una dieta poco saludable y la inactividad física, son bien conocidos,^[7] el componente de riesgo genético no está claramente definido. Se presume que el riesgo genético de enfermedades complejas como la DT2 es mayor cuando afectan a población más joven; sin embargo, los factores de riesgo genéticos para DT2 de inicio tardío no siempre se observan asociados a presentaciones tempranas de la enfermedad y viceversa.^{[8],[9]}

Se ha señalado que la DT2 de inicio temprano corresponde a un fenotipo más agresivo, los pacientes suelen ser más obesos, tienen mayores alteraciones lipídicas, peor control metabólico, mayores complicaciones crónicas, así como un alto riesgo de infarto y muerte cardiovascular.^{[10],[11],[12],[13]} Sin embargo, estas aseveraciones provienen de estudios que involucran pacientes mayores de 20 años y es de esperar que la presentación de la enfermedad en la edad pediátrica se relacione con un fenotipo aún más adverso.^[14]

Factores de riesgo para DT2

Como se mencionó previamente, la DT2 es una enfermedad multifactorial en la cual participan factores genéticos y ambientales que interactúan predisponiendo o protegiendo a los individuos para desarrollarla. Cuando los factores genéticos de susceptibilidad se combinan con factores ambientales nocivos se expresa la enfermedad.

Factores de riesgo ambiental

El tiempo en el que ha incrementado la incidencia de DT2 no ha sido suficiente para que se hayan presentado cambios significativos en el genoma humano que por sí mismos expliquen este aumento, por lo que los factores ambientales son en gran parte los responsables del incremento de la enfermedad en personas susceptibles.^{[15] [16]}

Se considera que la obesidad es el principal factor de riesgo adquirido para el desarrollo de DT2, esto apoyado por un incremento paralelo entre la obesidad y la incidencia de la enfermedad en diversos grupos poblacionales. Aproximadamente el 85% de los niños con DT2 son obesos a consecuencia de estilos de vida poco saludables relacionados con el sedentarismo y los malos hábitos de alimentación.^{[17] [18]} La presencia de obesidad, sobre todo aquella que se localiza a nivel visceral, ocasiona cambios metabólicos diversos (resistencia a la insulina, alteraciones en el metabolismo de los lípidos, estados proinflamatorios crónicos, etc.) que se asocian con mayor riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares.^[19]

Entre los factores de riesgo ambiental, también se han señalado los que influyen desde la etapa perinatal y que son capaces de programar alteraciones metabólicas que repercutirán en la vida adulta predisponiendo al desarrollo de DT2 como son: la exposición a diabetes gestacional, peso al nacimiento <2500 gr ó >4000 gr, así como el crecimiento acelerado durante los primeros meses de vida.^{[20] [21]}

Factores de riesgo genético

Los factores de riesgo genético permiten explicar por qué existe una mayor incidencia de la enfermedad en algunos grupos étnicos, así como en familiares de pacientes afectados, la diferencia en la concordancia entre gemelos monocigotos y dicigotos y el por qué la enfermedad se presenta solamente en algunos de todos los individuos expuestos a factores ambientales adversos.^[22]

Grupos étnicos de riesgo. Estudios multiétnicos han descrito que las poblaciones asiáticas, hispana, afro-americana e indígena de Norteamérica tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, siendo los indios Pima la población más susceptible.^{[23] [24] [25]} La Federación Internacional de

Diabetes señala que la prevalencia de la enfermedad en México es una de las más altas a nivel mundial.^[26]

Agregación, Transmisión y heredabilidad familiar. Las familias además de compartir factores genéticos también comparten factores ambientales que pudieran explicar la mayor frecuencia de la enfermedad en sus integrantes. Estudios realizados en gemelos plantean una heredabilidad entre 25-40%, lo que sugiere una interacción entre factores, genéticos y ambientales, que contribuyen sustancialmente al riesgo individual de presentar DT2.^[27]

Variantes genéticas. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías se han identificado variantes comunes (frecuencia del alelo menor o MAF >5%) asociadas a la enfermedad, que presentan un efecto pequeño sobre el fenotipo. Los estudios de Asociación de Genoma Completo (GWAS por sus siglas en inglés) han identificado más de 90 loci de susceptibilidad para DT2 y más de 50 loci para parámetros relacionados. A pesar del alto número de loci identificados, el impacto individual de cada variante estudiada es bajo y los loci de susceptibilidad a DT2 identificados explicarían aproximadamente sólo un 10% de la heredabilidad de la DT2.^[28]

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son un tipo de polimorfismo que producen una variación en un solo par de bases. Los SNPs forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen a lo largo del genoma humano aproximadamente cada 300 bases.

Los SNPs pueden encontrarse en regiones codificantes pudiendo alterar la estructura de la proteína y, por tanto, su función. También los SNPs pueden encontrarse en regiones no codificantes, las cuales están conservadas a través de las especies y pueden representar regiones reguladoras funcionalmente importantes.^[29]

SNPs asociados a diversos genes como *KLF14*, *ENPP1*, *ADAMTS9*, *ADIPOQ*, *IRS*, *GCKR*, *SREBF1*, *FTO*, *HNF4A*, *NOTCH2*, *IGF2BP2*, *CDKAL1*, *JAZF1*, *SCL30A8*, *HHEX*, *TCF7L2*, *EXT2*, *FTO* han sido asociados a DT2.^[30]

En nuestra población se han estudiado SNPs en adultos y su relación con el inicio de DT2 y se han reportado SNPs de los genes *SLC16A11*, *INS-IGF2*, *KCNQ1* y *SLC30A8* asociados a la enfermedad en ambos géneros, *CDKN2B* asociado exclusivamente en mujeres y *WFS1*, *IGF2BP2* y *TCF7L2* en hombres.^[31] Se han estudiado más de 64 SNPs en nuestra población, algunos de los cuales han sido consistentes incluso en edad pediátrica.

Antecedentes

Hay pruebas sólidas de agregación familiar y predisposición genética a la DT2 en población mexicana, incluyendo niños y adolescentes. También se han realizado estudios en los cuales se ha identificado la asociación de algunos SNPs con la presencia de DT2 de inicio en la edad pediátrica en población mexicana (Tabla 1).

Tabla 1 SNPs asociados a DT2 de inicio pediátrico^[32]

Gen reportado	rs	Clase funcional	Alelos	FAM(%) mexicanos	FAM (%) 1000 PG	OR	95% CI	p	Referencia
<i>SLC16A11</i>	rs13342232	Sinónimo	A/G	41.6	16.3	1.9	1.2-3.0	0.003	37
<i>ADORA1</i>	rs903361	Intergénico	A/G	27.8	37.7	1.9	1.2-3.0	0.010	38
<i>CADM2</i>	rs13078807	Intrón	A/G	9.3	8.7	2.2	1.2-4.0	0.009	
<i>GNPDA2</i>	rs10938397	Intergénico	A/G	32.5	32.6	2.2	1.4-3.7	9.0E-4	
<i>VEGFA</i>	rs6905288	Downstream (río abajo)	G/A	35.5	35.5	1.4	1.1-2.1	0.044	
<i>FTO</i>	rs9939609	Intrón	T/A	20.6	34.0	1.8	1.0-2.3	0.039	
<i>POC5</i>	rs2112347	Upstream (río arriba)	G/T	29.6	48.9	1.7	1.4-2.1	6.9E-4	39
<i>RPS10</i>	rs206936	Intrón	A/G	34.6	35.5	1.5	1.2-1.8	0.005	
<i>GLIS3</i>	rs7034200	Intrón	A/C	35.5	44.4	2.1	1.8-2.4	1.9E-6	
<i>LINGO</i>	rs10968576	Intrón	A/G	21.2	20.4	2.0	1.6-2.4	4.3E-4	

FAM: Frecuencia de alelo menos común; GP: Proyecto genoma

Como se puede observar, la magnitud de la asociación de cada uno de los SNPs es baja (OR 1.4 a 2.2), por lo que se ha propuesto que un perfil genético de susceptibilidad que incluya la suma de variantes de susceptibilidad podría explicar de mejor manera el riesgo genético de desarrollar DT2.

A diferencia de las enfermedades mendelianas, donde la presencia de una mutación específica es determinante y típicamente anuncia la eventual aparición de la enfermedad, el riesgo genético de enfermedades complejas y multifactoriales es probabilístico.^[33] Esto se debe a que, para rasgos complejos, la mayoría de las variantes genéticas asociadas ejercen efectos modestos, y la capacidad de cualquier variante individual para influir en los resultados clínicos es pequeña. De manera que uno de los enfoques es sumar los efectos de los alelos de riesgo asociados con una condición dada, para generar una estimación agregada del riesgo genético (GRS / Genetic Risk Score, por sus siglas en inglés). En la Tabla 2 se presentan los estudios que han evaluado distintos GRSs para la predicción de DT2 siendo la mayoría de ellos realizados en población, con escasa información en presentaciones de DT2 en la edad pediátrica.

Tabla 2. Estudios realizados evaluando distintos GRS para predecir inicio de DT2.

Autores / Año	Población y diseño	Resultados principales	Conclusiones
Andersson EA, 2013. [34]	Copenhage. (n=5,850). Cohorte, seguimiento a 5 años. Genotipificación 46 variantes	HR 1.06 (IC 95% 1.03-1.08). Regresión Cox ajustado a edad, sexo e IMC índice Hazard 1.10 en menores de 50 años y 1.06 en mayores de 50 años.	El GRS se asoció con la incidencia de diabetes y con la disminución de la reserva pancreática de insulina. Junto con el IMC se asoció con un aumento en los niveles de glucosa plasmática postprandial.
Saxena R. 2012 [35]	Estudio multiétnico de casos (n= 70,298) y controles (n= 17,418).	GRS con 26 variantes asociadas a DT2, y la señal de la región <i>GATAD2A</i> se asoció a riesgo en afroamericanos (OR=1,06 [IC del 95%: 1.04–1.08]; p <10 ⁻¹⁰), hispanos (OR = 1,07 [IC del 95%: 1.03–1.12]; p <10 ⁻³) y asiáticos (OR = 1.12 [IC del 95%: 1.04-1.22]; p <10 ⁻³).	El GRS evaluado se asoció a DT2 en múltiples grupos étnicos.
Layron J. 2018.[36]	Afro-americanos (n=4622), ≥18 años sin DT2, con información genética, demográfica y factores de riesgo clínicos iniciales.	El GRS se asoció con la incidencia de DT2 en modelos que incluyen factores de riesgo clínicos (HR=1.037, 95% CI: 1.006-1.070 y HR=1.029, 95% CI: 1.002-1.057).	El GRS se asoció significativamente con DT2 (riesgo 9% de mayor riesgo para DT2 en individuos con normoglu cemia inicial. GRS 5-7% mayor riesgo de DT2 entre los normotensos, baja HDL, e hipertrigliceridemia. Los resultados no mostraron que el GRS mejorara la predicción del

			riesgo sobre los factores de riesgo clínicos.
Stancakova A. 2017. [37]	n= 8,749 sin diabetes inicialmente, confirmada por CTOG 2hrs. Estudio de cohorte seguimiento a 8 años.	GRS _{GLUCAYUNO} (35 SNPs) y GRS _{GLUC2H} (9 SNPs) tuvieron efecto similar en la glucosa de ayuno FPG (0.025 mmol/l por unidad GRS) y de 2 horas (0.087 mmol/l por unidad GRS) en los niveles iniciales. GRS _{DT2} , GRS _{FPG} , GRS _{IS} se asociaron a un aumento del riesgo de presentar DT2 del 4% ,3%, 4% por alelo de riesgo respectivamente. GRS _{TD2} (76 SNPs) con HR 1.05 y P=1.0x10 ⁻⁹ tras el ajuste.	GRS _{TD2} , GRS _{FPG} , GRS _{IS} se asociaron significativamente con un incremento en la glucosa plasmática postprandial. (p< 0.0083). GRS _{TD2} se asoció a cambios en la glucosa y secreción de insulina. Los 3 GRS predicen el deterioro de la glucosa de ayuno y la incidencia de DT2. Añadir el GRS a un modelo de factores de riesgo clínico, aumenta escasamente la predicción de DT2. A más SNPs dentro de un GRS, mayor es su utilidad predictiva
Rao P. 2016.[38]	n= 461 casos con diagnóstico de DT2 y n= 434 controles.	El GRS se asoció a la susceptibilidad de DT2 (OR = 1.93, IC 95% = 1.42-2.62, p <0,001.	El GRS que se construyó acumulando el poder de 19 SNP lo convierte en una posible herramienta para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar DT2.
Pigeyre M. 2020. [39]	n= 341, 872 controles N = 16,320 casos con DT2.	Después de la estandarización, el ECA GRS se asoció con una mayor disminución en el riesgo de diabetes tipo 2 de 81% por 2,4 mmHg de PAM (0.19(0.07–0.51) P = 0,007 para la diferencia).	Genéticamente la concentración de ECA más baja se asoció con una menor prevalencia de diabetes tipo 2. Los hallazgos genéticos refuerzan el efecto protector causal de los inhibidores de la ECA sobre la diabetes tipo 2 y sugieren un efecto acumulativo a lo largo del tiempo.
Fontaine-Bisson. 2010. [40]	n= 1327 pacientes DT2 y n = 1424 controles.	Las probabilidades de DT2 por cuartil del GRS OR 1.25 (IC del 95% 1.17-1.34) Para el GRS OR = 1.33 (95% IC 1.24–1.43)	Agregar SNP previamente asociados con glucosa, insulina, lípidos u obesidad en ayunas a un GRS para DT2 aumenta significativamente el poder de discriminación entre personas con y sin DT2, con manifestaciones clínicas en comparación con un modelo que incluye sólo los loci convencionales para DT2.
J. M. de Miguel-Yanes P. 2011. [41]	3,471 sujetos del estudio Framingham estratificados por edad (<50 años, DT2 casos n=144; o >50 años, casos n = 302). Seguimiento por 34 años. Incluyó factores de riesgo clínico y un GRS de 40 SNP	En <50 años, el área bajo la curva de la predicción basado en factores de riesgo clínicos fue de 0.908 y aumentó a 0.911 con el GRS de 40SNP. En >50 el puntaje de 0.883 y 0.884 respectivamente (p=0.2).	El GR mejoró la predicción de DT2 con el uso del GRS de 40 SNPs con mayor efecto predictivo en <50 años.

HR = Hazard ratio OR = Odds ratio. GRS = genetic risk score. SNPs = single nucleotide polymorphism.

Planteamiento del problema

En México la DT2 representa un problema de salud pública debido a que su prevalencia ha ido en aumento y se está extendiendo a edades cada vez más tempranas. Se ha postulado que los factores genéticos pueden contribuir a las diferencias en la susceptibilidad para presentar la enfermedad entre los individuos, pero a pesar de lo anterior, la interacción de los factores genéticos con los factores ambientales de riesgo para el desarrollo de DT2, así como de otras alteraciones metabólicas no está completamente definida.

A pesar de que existe una gran cantidad de estudios que han identificado variantes genéticas asociadas a DT2 en distintos grupos étnicos, la información es menor en población mexicana, la cual parece tener genotipos de susceptibilidad propios que hasta la fecha no están completamente identificados. Aunado a lo anterior, aunque se considera que puede existir una mayor participación de factores genéticos en las enfermedades complejas cuando afectan a población de menor edad, la información sobre variantes genéticas en las presentaciones pediátricas de DT2 es todavía escasa. Pese a ello, se han identificado 10 SNPs asociados con la presencia de DT2 en población mexicana. A la fecha, no se ha explorado si la integración de estas variantes genéticas en un GRS ayuda a mejorar la predicción del desarrollo de DT2 en la edad pediátrica.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la utilidad de un GRS para la predicción de DT2 de inicio en la edad pediátrica?

Justificación

El aumento en la prevalencia e incidencia de la DT2 en todos los grupos etarios de nuestro país y el alto costo que conlleva la atención de la enfermedad y sus comorbilidades, llevan a la necesidad de contar con modelos de predicción diagnóstica y prevención desde etapas tempranas de la vida. Dado que se trata de una enfermedad multifactorial, además de los factores de riesgo clásicos para la enfermedad (ej. obesidad, antecedentes familiares, peso bajo o alto al nacimiento, etc.), se deben de incorporar factores de riesgo genético a los modelos de predicción.

El identificar población en riesgo permitirá reforzar medidas de prevención y detección oportuna de la enfermedad. Por otro lado, la falta de integración de factores genético continúa dejando descubierta la contribución de alrededor del 50% en la heredabilidad que tienen estos factores para el desarrollo de la enfermedad en la edad pediátrica en nuestra población.

Objetivos

General

Evaluar si un GRS con 10 SNPs asociados a DT2 de inicio en la edad pediátrica mejora la predicción del riesgo de la enfermedad en niños y adolescentes mexicanos.

Específicos

- Construir un GRS con los 10 SNPs de riesgo asociados a DT2 en niños y adolescentes mexicanos.
- Evaluar la integración del GRS a otros factores de riesgo para la predicción de DT2 en niños y adolescentes mexicanos.

Hipótesis

- El GRS se asociará con la presencia de DT2 de inicio en la edad pediátrica en población mexicana ($OR \geq 1.3$ por alelo de riesgo).
- El GRS mejorará la predicción de la enfermedad (>5%) en comparación con los factores de riesgo habituales para la enfermedad.

Métodos

Diseño del estudio

Estudio de casos y controles.

Población de estudio

- Caso con DT2 de inicio en la edad pediátrica. Se consideraron como casos pacientes menores de 18 años, con diagnóstico reciente de DT2 (menos de un mes), con inicio de la enfermedad antes de los 18 años, reclutados en la Clínica de Diabetes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. La presencia de DT2 fue determinada de acuerdo con los siguientes criterios:
 - Diagnóstico previo de DT2 y/o resultados positivos en una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes.^{42,43}
 - Ausencia de anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico y anti-insulina.
 - Sin características clínicas para considerar diabetes tipo MODY como:
 - Elevación leve y estable de la glucosa.
 - Múltiples miembros en la familia con diabetes sin características de tipo 1 (sin auto-anticuerpos pancreáticos, sin requerimientos o pocos requerimientos de insulina 5 años posteriores al diagnóstico) o de tipo 2 (obesidad marcada, acantosis nigricans).^{[42], [43]}
 - Niveles de péptido C ≥ 0.45 ng/mL.

Controles. Fueron contactadas solicitando a los casos que invitaran amigos, vecinos o conocidos con algún integrante de edad similar a los casos índices y que no tuvieran el diagnóstico de diabetes para que fungieran como controles poblaciones. La ausencia de la enfermedad fue corroborada al momento del estudio mediante una CTOG. Los controles no tenían relación familiar con los casos. Todos los participantes radicaban en la zona metropolitana del Valle de México y las tres generaciones a partir del caso índice eran nacidas en México. Nuestro grupo de investigación ha observado que la proporción ancestral de la cual proviene nuestra muestra consiste en 65% nativo americano, 30% europeo y 5% africano.^{[44], [45, 46]}.

Procedimientos

Las mediciones se realizaron en el Hospital Infantil de México Federico Gómez considerando las variables en el Anexo 1. Se invitó a los participantes y se les explicaron las características del estudio, objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios. Se solicitó la firma de las cartas de consentimiento informado, asentimiento y autorización para guardar muestras de sangre en un banco de ADN a cada uno de los participantes (Anexos 2, 3 y 4). El protocolo fue registrado y aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad de la Institución HIM 2009-017 / HIM 2013-014.

Los participantes acudieron en dos ocasiones para la realización del estudio. En la primera visita se obtuvo información sobre los antecedentes heredofamiliares y perinatales de los participantes y se realizaron mediciones de presión arterial y antropometría (Anexos 5 y 6). Los pacientes acudieron con ayuno de 12 horas y se tomó una muestra de glucemia capilar, así como muestras de sangre venosa para la determinación de las pruebas bioquímicas y los estudios genéticos. Adicionalmente, se aplicaron los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y actividad física (Anexos 7 y 8).

En una segunda visita programada 1 a 2 semanas después se realizó la prueba de Harvard para evaluar la condición física de los participantes. Se entregó por escrito un resumen de la valoración de su condición nutricia y de los exámenes de laboratorio. Asimismo, los pacientes recibieron asesoría sobre los estilos de vida para disminuir el riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. En los casos en los que se encontraron alteraciones que requerían de atención médica, los pacientes fueron referidos a su servicio de salud correspondiente.

Mediciones antropométricas y bioquímicas

Las medidas fueron tomadas por personal capacitado. Los participantes se midieron sin zapatos y con ropa ligera. El peso se midió con una escala digital (Seca 884, Hamburgo, Alemania) con precisión de 0.1 kg; la altura se determinó con un estadiómetro (Seca 225, Hamburgo, Alemania) con precisión de 0.1 cm. Se midió la circunferencia de cintura con los participantes de pie usando una cinta flexible (Seca 200), localizando en el punto medio entre el borde costal inferior y la cresta

ilíaca al final de la exhalación. La clasificación del índice de masa corporal (IMC) se realizó de acuerdo los criterios de la CDC (Centers of Disease Control, por sus siglas en inglés) y se consideró sobrepeso como un IMC entre percentil de 85 a 95 y obesidad un percentil >95.

Se obtuvo muestra de sangre periférica con ayuno de 12 horas para las determinaciones bioquímicas de: glucosa (mg/dL, método de hexoquinasa Dimensión RXL. MAX, Siemens), insulina (mU/mL, quimioluminiscencia IMMULITE 1000, Siemens, Euro, DPC, Llanberis, UK), péptido C (ng/dL, quimioluminiscencia IMMULITE 1000, Siemens, Euro, DPC, Llanberis, UK) y hemoglobina A1c (HbA1c % y mmol/mol, Dimensión RXL. MAX Siemens inmunoensayo).

En los participantes sin el diagnóstico de diabetes y en quienes la glucemia en ayuno fue <126 mg/dL, se realizó una CTOG con 1.75 g/kg de glucosa anhidra con un máximo de 75 gr. Se realizaron mediciones de glucosa e insulina 2 horas posteriores a la administración de glucosa (2 mL).

Para valorar la resistencia a la insulina se calculó el índice de HOMA-IR ($[\text{glucosa de ayuno en mg/dL} \times \text{insulina en ayuno en mU/mL}] / 405$).[\[47, 48\]](#)

Hábitos de alimentación y actividad física

La aplicación de los cuestionarios sobre hábitos de alimentación y actividad física fueron realizados por personal capacitado y cegado a la condición del participante. La ingesta de alimentos fue evaluada utilizando una versión adaptada de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos con una evaluación semicuantitativa considerando el mes previo a la evaluación (Anexo 7). Como material de apoyo, se utilizaron réplicas de alimentos para estandarizar el tipo y cantidad de los principales alimentos consumidos por los participantes. El cuestionario consta de 111 alimentos clasificados en 13 grupos. Se estimó la ingesta por día calculando la cantidad de alimento en relación con unidades de medida (ej. pieza, taza, plato, cucharada), así como el tamaño (chico, mediano o grande). Para el análisis de la frecuencia de consumo se calcularon los gramos o mililitros de la ingesta por día de cada uno de los alimentos. El análisis nutrimental se realizó mediante el programa Food Processor® (versión 10.10, 2012, ESHA Research Inc., Salem, OR), que incluye alimentos de la dieta mexicana. Se calcularon los porcentajes de adecuación de energía e ingesta de macronutrientes de acuerdo con las recomendaciones para la población mexicana.

La actividad física se estimó mediante un cuestionario (Anexo 8). Los participantes contestaron preguntas acerca de la intensidad, frecuencia y duración de sus actividades físicas por semana. Se utilizó un procedimiento estandarizado utilizando una escala continua para medir el gasto energético como equivalentes metabólicos (MET/minutos/día). Un MET corresponde a 3.5 ml O₂/kg⁻¹/min⁻¹.[\[49\]](#)

Prueba de condición física (Harvard)

Se evaluó la condición física utilizando la prueba del escalón de Harvard modificada, la cual consiste en subir y bajar un escalón de 30 cm de altura, 42 cm de ancho y 38 cm de profundidad durante 5 minutos a una velocidad de 30 ciclos por minuto con ambos pies. Se registró la frecuencia cardiaca a los 0, 1 y 2 minutos posteriores a que los participantes completaran la prueba o ellos mismos detuvieran el ejercicio prematuramente. El índice de condición física se calculó mediante el total de segundos multiplicado por 100 y dividido por la suma de las 3 frecuencias cardiacas registradas.[\[50\]](#)

SNPs y Genotipificación

Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica para la obtención del material genético a partir de leucocitos. El aislamiento de ADN y la identificación de los SNPs se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda del Centro Médico Nacional siglo XXI. Los SNPs del GRS fueron seleccionados en base a su asociación previa con DT2 de inicio en la edad pediátrica en nuestra población.[\[32, 51-53\]](#)

El ADN se extrajo utilizando el Mini/Kit QIAamp (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm (Epoch® spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) considerando un cociente de pureza entre 1.7 y 1.9. La integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis con geles de agarosa al 0.8%, y la integridad se comprobó en un gel de agarosa del 0.8%. La genotipificación se realizó mediante sondas TaqMan OpenArray (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que realizan un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real de acuerdo con las instrucciones del fabricante, alcanzando una tasa de éxito >95%.

Puntaje de riesgo genético (GRS)

Examinamos un total de 10 SNPs (para los nombres genéticos, funciones y rasgos asociados, véase **Tabla 1**). En estudios previos se determinó la asociación de estos 10 SNPs con el inicio temprano de DT2 independientemente del IMC.[[32](#), [51](#), [52](#), [54](#)] La construcción del GRS se realizó sumando el número de alelos de riesgo de los 10 SNPs incluidos (cero, uno o dos).

Formación de recursos humanos

El residente de pediatría contribuyó en la recolección de datos relacionados con los factores de riesgo clínico, la integración de la base de datos y la redacción de manuscritos.

Tamaño de muestra

El cálculo de tamaño de muestra se realizó para estudios de asociación génica, considerando de forma individual cada uno de los SNPs incluidos. La estimación se realizó mediante el programa Quanto v2.1. En este modelo logístico se consideró un tipo de herencia multifactorial, alfa de 0.05, poder de 0.8 y la frecuencia de la variante génica reportada en el Hapmap obteniendo un tamaño de muestra de 100 participantes por grupo para un $OR \geq 1.3$. Sin embargo, a pesar de que la incidencia de la enfermedad ha incrementado en población pediátrica, la prevalencia de DT2 en niños y adolescentes continúa siendo baja por lo que se logró incluir 97 casos y 83 controles obteniendo un poder de 0.77.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas, clínicas y bioquímicas mediante la determinación de frecuencias, media y desviación estándar (DE) de acuerdo con el tipo de variable. El manejo de la base de datos se realizó en el programa STATA (version 11.0; STATA Corp, College Station, TX). Se utilizó el programa Food Processor SQL (versión 10.9.0, 2011, ESHA Research, Salem, Oregon) para el análisis del aporte calórico, así como de macro y micronutrientes. Las diferencias entre casos y controles se evaluaron mediante la prueba t de

Student para las variables continuas de distribución normal, U de Mann-Whitney para diferencias de medianas y chi-cuadrada para las variables categóricas.

Para el análisis de la asociación de los SNPs se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Se estiman razones de momios e intervalos de confianza al 95%. Se consideró el modelo aditivo asignando un valor numérico (0, 1 o 2) en base al número de alelos de referencia. Estos análisis se realizaron en el programa STATA versión 11.0 (STATA Corp., College Station, TX).

Finalmente se identificó la asociación de factores de riesgo asociados a DT2 (IMC, antecedente familiar de la enfermedad, factores de riesgo perinatales, condición física, etc.) y se construyó el GRS con la suma de los alelos de riesgo identificados. Se analizaron tres modelos de regresión logística: 1. Modelo con la inclusión de los factores de riesgo ya conocidos para la enfermedad y que fueron identificados como significativos en la muestra estudiada (edad, sexo, Z-score del IMC y antecedente materno de DT2), 2. Modelo con el GRS; y 3. Modelo combinado con los factores de riesgo clínicos y el GRS. Se analizó el área bajo la curva para evaluar la capacidad discriminadora para identificar la presencia de DT2 de inicio en la edad pediátrica de los modelos. Adicionalmente se realizó un análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic por sus siglas en inglés) para identificar la capacidad predictiva de cada uno de los modelos.

Resultados

En el estudio se incluyó un total de 97 casos con DT2 de inicio en edad pediátrica y 83 controles menores de 18 años sin diagnóstico de DT2. En la Tabla 3 se muestran las características clínicas de los participantes. Como era esperado, se observaron mayores índices de obesidad y niveles de glucosa y resistencia a la insulina en el grupo de participantes con DT2. Adicionalmente, se observó mayor frecuencia de antecedentes familiares de DT2 y exposición a diabetes durante la gestación en el grupo de casos. Paradójicamente, se reportó un menor consumo calórico y mayor actividad física en el grupo de casos; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el índice de condición física entre los grupos.

Todos los SNPs analizados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg y tuvieron efecto en la dirección esperada. El modelo de regresión logística ajustado para edad, género y Z-IMC mostró que, posterior a la corrección de Bonferroni, 2 SNPs se asociaron significativamente a DT2 de inicio en edad pediátrica, mientras otras 6 variantes estuvieron asociadas, pero no alcanzaron significancia tras la corrección de Bonferroni. La magnitud de la asociación de los SNPs se identificó con razones de momio entre 1.2 y 2.7 (**Figura 1**).

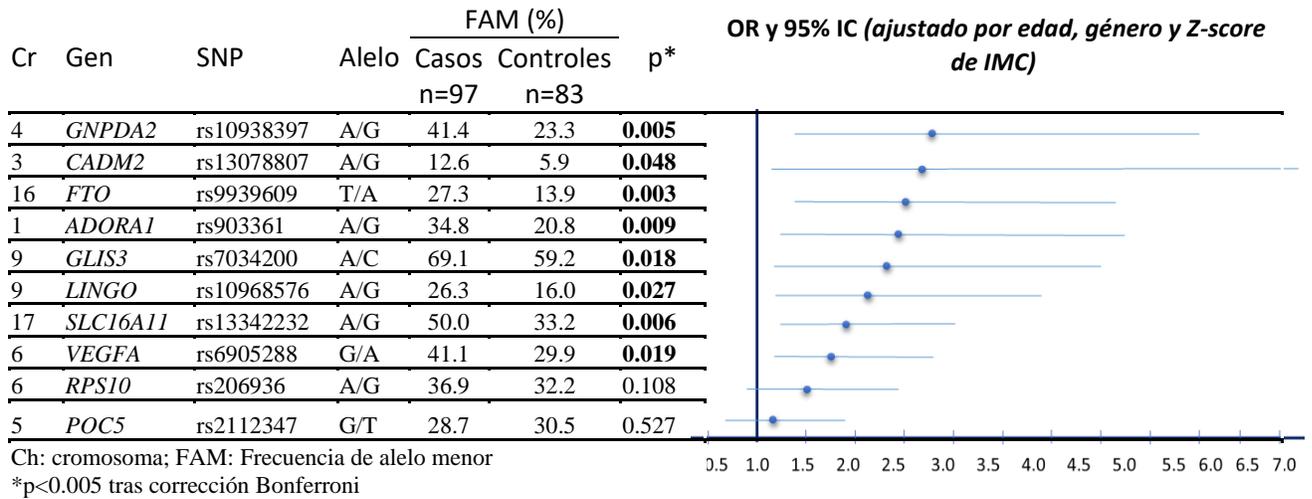
Tabla 3 Características clínicas de casos y controles.

	Casos (n = 97)		Controles (n= 83)	
Sociodemográficos y antropométricos				
Mujeres n (%)	45	(46.4)	38	(45.2)
Años (edad)	12.9	± 2.6	12.5	± 2.9
Peso (kg)	64.2	± 20.3	57.15	± 21.4*
Talla (cm)	157.2	± 13.3	152.4	± 14.7*
IMC (kg/m²)	25.3	± 5.3	24.4	± 6.7
IMC (Z-score)	1.5	± 0.7	1.0	± 1.1*
Circunferencia cintura (cm)	86.5	± 15.0	80.2	± 19.4*
Factores bioquímicos				
Glucosa en ayuno (mg/dl)	149.6	± 77.2	89.0	± 8.5*
Glucosa a las 2hrs (mg/dL)	-	-	97.4	± 19.7
HbA1c (%)	9.6	± 3.4	5.6	± 0.5*
Insulina (mUI/ml)	15.0	± 19.6	10.3	± 9.1*
HOMA-IR	5.2	± 0.7	2.3	± 0.3*
C-peptide (ng/dL)	2.4	± 2.2	2.8	± 2.3
Historia familiar de DT2				
Madre	39	(57.1)	8	(10.3)*
Padre	17	(27.4)	4	(6.9)*
Abuela materna	39	(40.6)	17	(21.0)*
Abuelo materno	37	(42.5)	15	(20.3)*
Abuela paterna	26	(28.0)	18	(23.4)
Abuelo paterno	19	(22.1)	19	(25.7)
Factores perinatales				
Peso al nacimiento (kg)	3.3	± 0.6	3.1	± 0.5
Edad gestacional (semanas)	37.9	± 1.8	37.7	± 1.8
Exposición a diabetes gestacional n (%)	13	(14.1)	1	(1.3)*
Seno materno (meses)	9.5	± 9.8	7.4	± 5.7
Estilo de vida				
Kcal/día	1783	± 910	2316	± 1152*
% Carbohidratos	54.5	± 8.1	54.9	± 8.8
% Lípidos	27.2	± 8.1	30.5	± 7.2*
Actividad física (METS)	4.2	± 5.2	2.6	± 4.6*
Prueba de Harvard	72.3	± 24.7	74.1	± 23.7

Valores expresados en media ± desviación estándar o n (%) de acuerdo con el tipo de variable. *p<0.05 T de Student, U de Mann Whitney o chi cuadrada de acuerdo al tipo de variable.

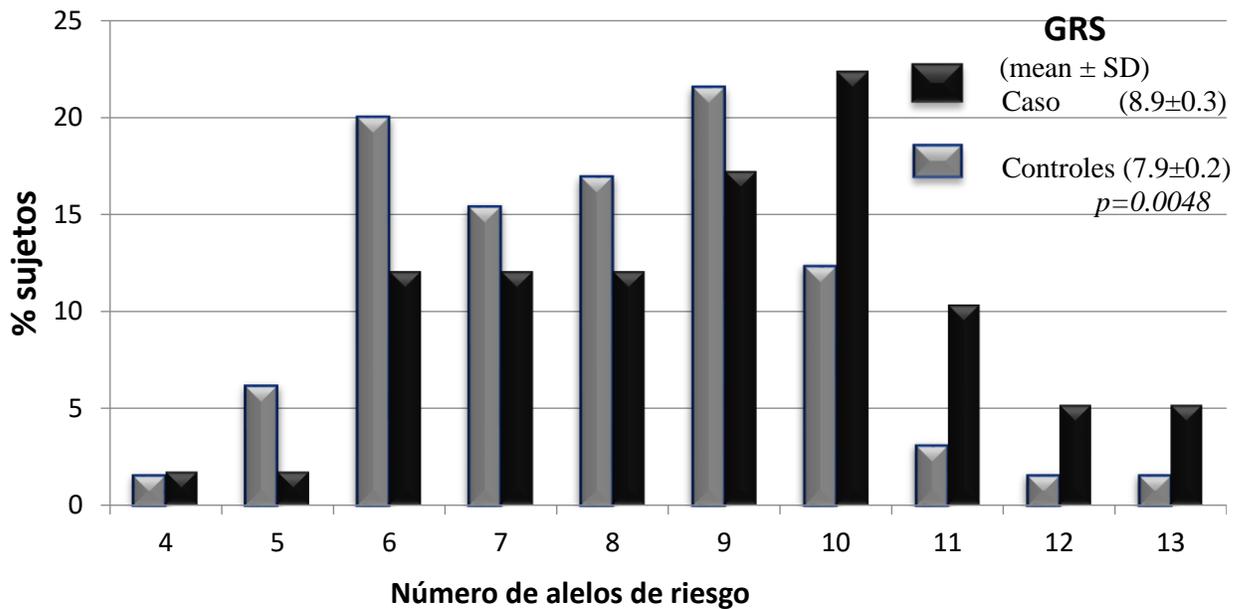
IMC: índice de masa corporal.

Figura 1. Frecuencia de alelos y su asociación entre SNPs y DT2 de inicio pediátrico



Se calculó el GRS mediante la suma de los alelos de riesgo identificados en cada uno de los participantes. En la **Figura 2** se observan las diferencias en la distribución del GRS entre los grupos, con una mayor frecuencia de 10 alelos de riesgo o más en el grupo en los participantes con DT2 en comparación a los controles (p=0.048). Es decir, el puntaje de GRS fue mayor en los casos de DT2 de inicio pediátrico comparado con los controles.

Figura 2. Densidad del GRS basado en 10 SNP entre casos y controles



En la **Tabla 4** se muestran los resultados del análisis de regresión logística. En el Modelo 1, se presenta el modelo reducido de las variables clínicas asociadas con la presencia de DT2 de inicio en la edad pediátrica, identificado al Z-IMC (OR = 1.7; p = 0.009) y el antecedente materno de DT2 (OR = 7.1; p < 0.001) como factores de riesgo clínicos significativos e independientes para predecir el inicio de DT2 en edad pediátrica. No se identificaron otros factores clínicos asociados a la DT2. En el Modelo 2 se observó que el GRS se asoció significativamente a DT2 en la edad pediátrica (OR 1.3 por alelo de riesgo; p = 0.006). Finalmente, en el Modelo 3 se identificó el mismo efecto del GRS tras ajustar para el Z-IMC, diabetes materna, edad, género y puntaje de condición física (prueba de Harvard).

La pseudo R² de McFadden's del Modelo 1 que incluye únicamente variables clínicas se reportó en 0.15 (p<0.001), la del Modelo 2 en 0.14 ((p<0.0019 y la del Modelo 3 incrementa significativamente con la combinación de los previos en 0.21 (p < 0.01).

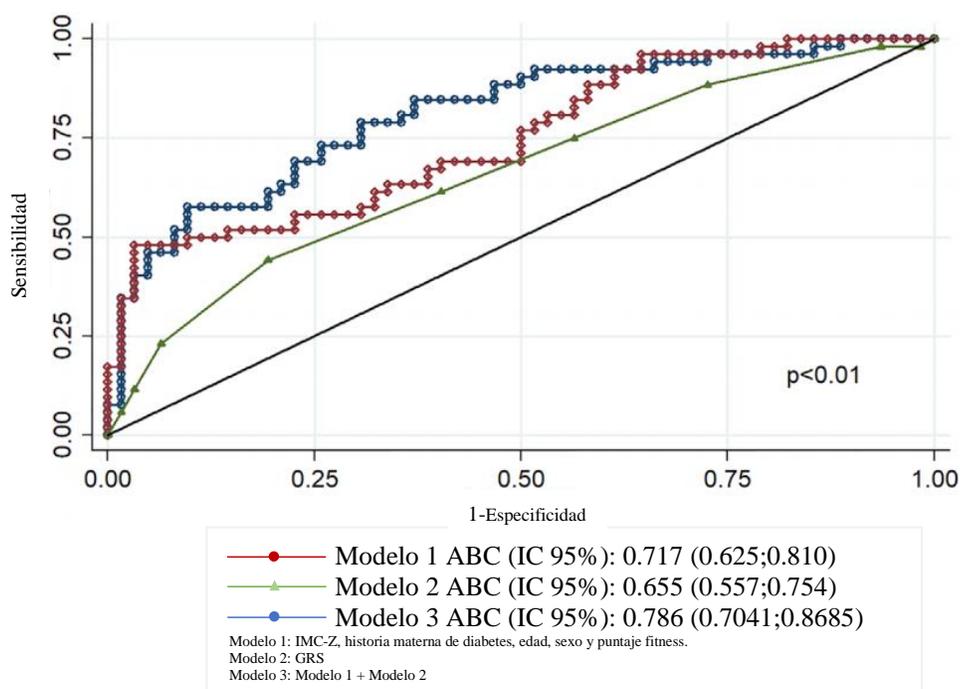
Tabla 3 Análisis de regresión logística para inicio de DT2 en la edad pediátrica usando factores de riesgo clínicos y GRS como predictores.

	OR	IC 95%	p
MODELO 1 (pseudo R²=0.15, p<0.001) *			
IMC (Z-score)	1.7	1.1 ; 2.5	0.009
Diabetes Materna	7.1	2.8 ; 17.8	<0.001
Edad (años)	1.1	0.9 ; 1.2	0.444
Género (hombre)	1.1	0.6 ; 2.3	0.72
Puntaje fitness	0.9	0.9 ; 1.0	0.822
MODELO 2 (pseudo R²=0.14, p<0.001)			
GRS (riesgo por alelo)	1.3	1.1 ; 1.6	0.006
MODELO 3 (pseudo R²=0.21), p<0.001) *			
GRS (riesgo por alelo)	1.3	1.0 ; 1.6	0.025
IMC (Z-score)	1.5	0.9 ; 2.4	0.146
Diabetes Materna	8.5	2.8 ; 26.1	<0.001
Edad (años)	1.1	0.9 ; 1.3	0.332
Género (hombre)	1.2	0.5 ; 2.9	0.75
Puntaje fitness	1.0	1.0 ; 1.0	0.778

*McFadden's pseudo R²
OR: odds ratio (RM), IC intervalo de confianza.

La **Figura 3** muestra el análisis de las curvas ROC en donde se reporta el área bajo la curva para la identificación de la DT2 en la edad pediátrica acorde con los 3 modelos. Como se puede observar, las variables clínicas incluidas en el Modelo 1 presentan un mejor rendimiento para identificar DT2 en comparación al GRS del Modelo 2. Sin embargo, la adición de GRS a los factores clínicos incrementa el área bajo la curva en 7 punto porcentuales.

Figura 3. Área bajo la curva para DT2 de inicio pediátrico



ABC: área bajo la curva.

Discusión

Desarrollar modelos de predicción para la identificación de individuos en riesgo de desarrollar DT2 de inicio temprano es importante para establecer medidas que ayuden a prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad. Recientemente, varios estudios han demostrado variantes genéticas asociadas a la DT2 de inicio en la edad pediátrica. ([25, 55-60]).

Dado que dichos SNPs individualmente tienen una baja capacidad predictiva para la identificación de DT2, la conjunción de variantes dentro de un GRS, brinda la oportunidad de evaluar los efectos acumulativos de los factores genéticos. Aunque ya ha sido reportado que un GRS se puede asociar

a presentaciones más tempranas de la DT2 [61], hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio en evaluar la utilidad del GRS para predecir DT2 de inicio pediátrico en la población mexicana. Nuestros resultados resultan relevantes para determinar la utilidad real de los factores genéticos para identificar poblaciones susceptibles en países de bajos a medianos ingresos.

El presente estudio identificó que más del 95% de los casos de DT 2 de inicio pediátrico tenían seis o más alelos de riesgo y una media más alta de GRS en comparación con los controles. Aunque el riesgo por alelo individual fue bajo (OR 1.3, IC 95%: 1.1; 1.6), la combinación de marcadores puede indicar un mayor riesgo. Estos resultados coinciden con los hallazgos de otros autores en estudios tanto transversales como de seguimiento, en los que diferentes GRS se asociaron con rasgos relacionados con DT2 en adultos de diferentes grupos étnicos (OR 1.06 a 2.2 por alelo de riesgo). Sin embargo, la mayoría de los estudios mencionados incluyeron decenas a cientos de loci de susceptibilidad [62-77]. La información presentada en este estudio respalda la utilidad de la GRS en modelos de predicción para T2D independientemente de los factores de riesgo ambientales.

Nuestros resultados informan sobre la utilidad del GRS propuesto para mejorar los modelos de predicción de DT2 en niños y adolescentes. Observamos que el modelo que incluye solo variables clínicas (Z-IMC, diabetes materna, edad, sexo y puntaje de condición física) tenía un valor de pseudo R^2 de 15%, mientras que la incorporación del GRS lo incrementó hasta el 21%. Abdullah y col. informaron anteriormente que la inclusión de un GRS promovió un aumento de aproximadamente 1% -2% en pseudo R^2 a los factores clínicos [78].

Los hallazgos presentados muestran que mientras el GRS tuvo una menor capacidad predictiva DT2 de inicio pediátrico en comparación con los factores clínicos, la combinación de ambos factores dio lugar a un aumento modesto, pero significativo en la predicción de la enfermedad. El GRS genotipado en el presente estudio tuvo una mejor área bajo la curva (0.66) en comparación con el reportado en otros estudios en donde GRS con <10 SNPs tenían áreas que oscilaban entre 0.56 y 0.59, GRS con 10 a 20 SNPs entre 0.55 y 0.68 y GRS con > 30 SNPs entre 0.58 a 0.64 [79]. Por otro lado, modelos de riesgo convencionales que incluían variables, como edad, sexo, IMC, nivel de actividad física, antecedentes familiares de diabetes, etnia, tabaquismo, consumo de alcohol, circunferencia de cintura, relación cintura-cadera y presión arterial, reportaron áreas que oscilan

entre 0.63 y 0.96 [80]. Los hallazgos antes mencionados son similares a los presentados en este estudio, donde se logró un área bajo la curva de 0.72 para el modelo que incluye factores de riesgo clínico (Z-IMC, antecedentes maternos de DT2, edad, sexo e índice de condición física evaluado por la prueba de Harvard).

Estudios previos han informado que la inclusión genética de marcadores resulta en una ligera mejora en el área bajo la curva que va de 0 a 0.12, con una reclasificación neta del riesgo de DT2 en los modelos de predicción -2.2% a 10.2% [81]. Por el contrario, en nuestro estudio identificamos un incremento de 7 puntos porcentuales en el área bajo la curva posterior a combinar el GRS y los factores clínicos, un hallazgo consistente con lo informado en estudios previos donde se observó que hubo un aumento aproximadamente de 1 a 6 puntos porcentuales para el inicio de DT2 en adultos y diabetes gestacional tras añadir el GRS [51, 63, 65-67, 69, 74, 82]. Estudios más grandes han informado que un GRS promueve una mejora considerable en la discriminación de la incidencia de DT, como Talmud et al., [73] quienes mostraron una mejora neta de reclasificación de la enfermedad en 8.1% y Läll et al., [68] quienes reportan una mejora de 3.4% . A pesar de que el incremento de SNPs incluidos en un GRS puede mejorar su precisión, esto impacta en los costos y complejidad del modelo.

La información específica para poblaciones pediátricas es escasa, con reportes previos que no logran identificar la utilidad de incorporar el GRS en modelos de predicción. Vassy y et al., evaluaron modelos para la incidencia de DT2 utilizando factores de riesgo evaluados en la adolescencia (datos demográficos, antecedentes familiares, examen físico y biomarcadores) junto con 38 SNPs. Aunque sus hallazgos mostraron una razón de riesgo de 1.06-1.09 por alelo de riesgo, la adición del GRS no mejoró la capacidad discriminativa del modelo [75]. Pitkänen et al., quienes evaluaron si la adición de un GRS ponderado basado en 73 variantes genéticas a los factores de riesgo infantil mejora la identificación del riesgo de DT2 durante la edad adulta, informó una reclasificación neta menor y no significativa para DT2 (2.1% , $p = 0.158$) [72].

Factores de riesgo genéticos que pueden medirse objetivamente, permanecen sin cambios a lo largo de la vida, siendo un factor de riesgo estable. Sin embargo, la genotipificación conlleva costos mucho mayores en comparación con la medición de los factores de riesgo convencionales, que, en

la mayoría de los casos, solo requiere un historial médico y un examen físico. A pesar de la mejora en la clasificación del riesgo de aparición de DT2 en edad pediátrica después de incluir un GRS, los efectos son modestos comparados con factores de riesgo no genéticos (Z-IMC e historia de diabetes materna), por lo que la evidencia es insuficiente para recomendar la incorporación de un GRS en la práctica clínica. En otras palabras, a pesar de la relevancia substancial de un GRS para los estudios de investigación, proporciona un valor clínico limitado a la práctica médica rutinaria dados sus beneficios modestos para mejorar la predicción DT2 sobre los factores de riesgo clínicos tradicionales. Otros autores han informado resultados similares, en los que la información genética no proporciona mejoría considerable en la predicción de la enfermedad en comparación a marcadores no invasivos como edad, antecedentes familiares de DT2 y obesidad [71].

Antecedentes familiares de diabetes y, en casos específicos la historia materna de diabetes, refleja no solamente una predisposición genética, sino también factores de riesgo ambientales compartidos e incluso programación fetal [54, 70]. Do et al., demostraron que un historial familiar completo proporciona una mejor predicción que el conjunto de 21 SNPs [64]. Los estudios han indicado que los antecedentes familiares de DT2 siguen siendo un factor de riesgo importante, independiente y de fácil evaluación para DT2 [76].

La mayoría de los SNP incluidos en este estudio también se han asociado con la obesidad. Sin embargo, según lo informado por otros autores, observamos que una predisposición genética a la obesidad conduce a un mayor riesgo de DT2 independientemente del Z-IMC [77]. Otros autores que han evaluado el GRS en conjunto con factores de riesgo no genéticos (obesidad, estilo de vida poco saludable, antecedentes familiares de DT2 en familiares de primer grado y nivel socioeconómico) han confirmado que estos últimos conducen a un mayor riesgo de DT2 [60, 78-80]. Estas observaciones destacan la necesidad de priorizar la prevención de la exposición ambiental sobre los factores genéticos los cuales no son modificables. El punto principal que debe destacarse es que las intervenciones en el estilo de vida han demostrado ser eficaces para prevenir o retrasar la aparición de DT2 y podrían atenuar el efecto de las variantes genéticas [33, 81, 83-90]. Además, las personas que aumentan de peso pueden ser más susceptibles al impacto acumulativo de las variantes de DT2 [34].

El estudio actual evaluó los factores de riesgo ambiental en conjunto con un GRS que incluyó SNPs previamente reportados asociados con DT2 de inicio en edad pediátrica en población mexicana [32, 51, 52]. Sin embargo, el modelo combinado (GRS y factores clínicos) solo explicó el 21% de la varianza entre casos y controles.

En conclusión, el presente estudio mostró que un GRS basado en 10 SNP mejora la clasificación del riesgo de DT2 en la edad pediátrica en mexicanos, lo que indica la potencial utilidad de añadir información genética en la práctica clínica. Sin embargo, factores clínicos como la historia materna de DT2 y el Z-IMC, que pueden ser fácilmente evaluados en la consulta, continúan siendo los principales factores de riesgo.

Los resultados de este estudio fueron publicados en Frontiers in Endocrinology 2021;12:article647864 (Anexo 9).

Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones de este estudio es que nuestros resultados pueden no ser generalizables a poblaciones con diferentes orígenes étnicos.

Otras limitaciones incluyen el diseño transversal, que limitó nuestra capacidad para determinar los efectos de los factores de riesgo sobre la progresión de la diabetes tipo 2 a lo largo del tiempo, el pequeño número de individuos incluidos debido a la baja prevalencia de la enfermedad entre los pacientes pediátricos, así como las mediciones subjetivas de patrones dietéticos.

Adicionalmente, no podemos descartar otros modelos no aditivos como alternativa al GRS no ponderado utilizado en este estudio o bien la incorporación de un mayor número de variantes entre los cientos de SNP asociados que pudieran mejorar la predicción de la enfermedad. Además, no pudimos confirmar la asociación entre los hábitos alimentación y el riesgo de DT2 de aparición en edad pediátrica. Consideramos que el diseño de casos y controles limita la identificación de hábitos alimentarios que aumentan el riesgo dado que el manejo nutricional de los casos se estableció en el momento del diagnóstico. No obstante, los estudios de seguimiento tal vez podrían evaluar de forma

más confiable el efecto de los hábitos alimenticios sobre el riesgo de DT2 como ha sido reportado.[91, 92]. A pesar de que no pudimos observar una asociación entre los hábitos dietéticos y la DT2, la implicación de la alimentación es obvia dado que es el principal determinante del Z-IMC. Tomado en conjunto, se requieren estudios más amplios que empleen un diseño prospectivo e incluyan otros SNP, así como medidas más objetivas de factores no genéticos.

Cronograma de actividades

Actividades	2018	Ene-Oct. 2019	Nov-Mar 2020	Abr 2020	Mayo 2020	Jun-Ago 2020	Sep-Nov 2020	Nov- Dic
Protocolo	X							
Reclutamiento de pacientes y toma de medidas	X							
Elaboración de base de datos		X	X					
Búsqueda de bibliografía	X	X	X	X	X	X		
Elaboración de tesis				X	X	X		
Análisis de datos y resultados						X	X	
Redacción de artículo							X	X
Publicación								X

Anexos

Anexo 1. Definición de variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	UNIDAD DE MEDICIÓN	DEFINICIÓN OPERATIVA
PERFIL CLÍNICO			
Edad	Cuantitativa, continua	Años	Se obtuvo de la diferencia de tiempo entre la fecha de nacimiento y la fecha en que se realizó el estudio.
Sexo	Nominal, dicotómica	Femenino masculino	Características fenotípicas que clasifican a las personas en hombres o mujeres.
Peso	Cuantitativa, continua	Kilogramos	Medición por un solo observador en báscula calibrada, con el paciente en ayuno, con ropa ligera y sin zapatos y se aproximó a la décima de kg más próxima.
Talla	Cuantitativa, continua	Metros	Medición en estadiómetro por un solo observador, sin zapatos. Se coloca la cabeza del paciente en el plano de Frankfurt y se realiza una tracción de la cabeza a nivel de las apófisis mastoides. Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadiómetro hasta contactar con la cabeza del paciente. Se obtuvo la talla máxima y se ajustó al milímetro más próximo.
Índice de masa corporal	Cuantitativa, continua	Kg/m ²	Relación del peso en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros, que mide de forma indirecta el grado de adiposidad.
Circunferencia de cintura	Cuantitativa, continua	Centímetros	Medición con cinta métrica flexible a la miPAD de la distancia de la última costilla y la cresta iliaca en espiración, realizada por un solo observador.
Presión arterial	Cuantitativa, continua	mm/Hg	Posterior a 5 min de encontrarse el paciente en sedestación con un brazalete que cubre 2/3 la longitud del brazo y utilizando baumanómetro de mercurio, se determinará las cifras de presión arterial en tres ocasiones, y el promedio de las dos últimas será considerada como la cifra de presión arterial final.
PERFIL BIOQUÍMICO			
Glucosa de ayuno	Cuantitativa, continua	mg/dL	Medición de glucosa plasmática con 12 horas de ayuno mediante el método de glucosa oxidasa.
Glucosa 120 min	Cuantitativa, continua	mg/dL	Determinación de glucosa 120 min posteriores a una carga de glucosa anhidra de 1.75 g por kg de peso (máximo 75 g) mediante el método de glucosa oxidasa.
Insulina basal	Cuantitativa, continua	mUI/mL	Niveles de insulina posterior a 12 horas de ayuno determinados por quimioluminiscencia.
Insulina 2 horas	Cuantitativa, continua	mUI/mL	Niveles de insulina 120 min posteriores a una carga de glucosa anhidra de 1.75 g por kg de peso (máximo 75 g) determinados mediante quimioluminiscencia.
HbA1c	Cuantitativa, continua	%	Determinación del porcentaje de la fracción de hemoglobina glucosilada en sangre mediante inmunoensayo.
HOMA-IR	Cuantitativa, continua	índice matemático	Índice de resistencia a insulina, calculado mediante la siguiente fórmula: <i>Insulina en ayuno x glucosa en ayuno /405.</i> La insulina expresada en μ UI/mL y la glucosa en mg/dL.
Péptido C	Cuantitativa, continua	ng/dL	Niveles de péptido C como indicador indirecto de reserva pancreática, determinados por el método de quimioluminiscencia posteriores a 12 horas de ayuno.
ANTECEDENTES PERINATALES			

Edad materna al nacimiento	Cuantitativa, continua	Años	Edad cronológica de la madre al momento del nacimiento de cada uno de los integrantes de la tercera generación de las familias.
Número de hijo	Cuantitativa, discreta	valor absoluto	Orden del nacimiento del caso índice, niño control o sus hermanos.
Exposición a diabetes intrauterina	Dicotómica	sí no	Antecedente obtenido mediante interrogatorio de acuerdo a la presencia de diabetes materna previo o durante la gestación.
Peso al nacimiento	Cuantitativa, continua	G	Antecedente obtenido en la hoja de alumbramiento, certificado de nacimiento o nota de egreso hospitalario sobre el peso al nacimiento.
Alimentación al seno materno	Dicotómica	sí no	Antecedente obtenido mediante interrogatorio directo a la madre sobre la alimentación al seno materno en los integrantes de la tercera generación de las familias.
Duración de alimentación al seno materno	Cuantitativa, continua	Meses	Antecedente mediante interrogatorio directo a la madre sobre el tiempo en el que los integrantes de la tercera generación de las familias recibieron alimentación al seno materno.
Seno materno exclusivo	Cuantitativa, continua	Meses	Antecedente obtenido mediante el interrogatorio directo a la madre sobre el tiempo durante el cual los integrantes de la tercera generación de las familias recibieron alimentación exclusiva al seno materno.
Edad de ablactación	Cuantitativa, continua	Meses	Antecedente obtenido mediante el interrogatorio directo a la madre sobre la edad en la cual se introdujeron alimentos distintos a la leche materna en los integrantes de la tercera generación.
HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN			
Macro y micronutrientes	Cuantitativa continua	g / mg / caloría / día	A partir del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos realizado de forma directa a cada uno de los integrantes de las familias se obtendrá el número de porciones consumidas al mes y el tamaño de las mismas, a partir de lo cual se estimará el promedio de ingesta de macro y micronutrientes por día mediante el programa The Food Processor ®
CONDICIÓN FÍSICA			
Prueba de Harvard	Cuantitativa continua	índice matemático	También conocida como prueba del escalón, consiste en registrar los latidos del corazón posterior a subir y bajar con ambos pies un escalón de 30 cm de alto, 42 cm de ancho y 38 cm de profundidad durante 5 min a un ritmo de 30 veces por minuto. El registro de la frecuencia cardíaca se realiza después de haber terminado los 5 min o de que el paciente suspendiera la prueba de forma prematura por fatiga, realizándose la medición de la frecuencia cardíaca a los 0, 1 y 2 min post ejercicio. Posteriormente se calcula el índice de recuperación dividiendo el tiempo total en minutos multiplicado por 100 entre la suma de las 3 determinaciones de frecuencia cardíaca. Estudios previos han indicado que el índice de recuperación se considera pobre si es menor a 55, bajo de 55 a 64, alto de 65 a 79, bueno de 80 a 89 y excelente de más de 90. [93]
FACTORES GENÉTICOS			
SNPs	Nominal	Homocigoto para el ancestro o la variante y heterocigoto	Polimorfismos obtenidos mediante técnica de de microarreglos o mediante sondas TaqMan de manera individual.

Anexo 2. Carta de consentimiento informado



Polimorfismos de un solo nucleótido asociados con diabetes mellitus tipo 2 en familias de niños y adolescentes mexicanos.

Su familia y usted han sido considerados para realizar un estudio de investigación en el que se busca la presencia de factores que predisponen al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en niños.

Se sabe que existen factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y tanto usted como su familia cuentan con uno o más de éstos como son: ser mexicanos, familiares de primer o segundo grado con la enfermedad, tener sobrepeso u obesidad, datos de resistencia a la insulina, inactividad física, diabetes durante el embarazo, hijos con peso mayor a 4kg al nacimiento, presión arterial alta y dislipidemia (alteraciones en las grasas de la sangre), entre otros. Existen recomendaciones que apoyan la búsqueda de alteraciones metabólicas en personas con riesgo, por lo que consideramos que ustedes son candidatos para recibir una valoración médica y poder detectar alteraciones de forma temprana. En el estudio requerimos que usted y su familia acudan en dos ocasiones al Hospital Infantil de México Federico Gómez, para llevar a cabo una serie de estudios, que a continuación le explicamos:

Visita 1

Usted y su familia deberán acudir el día de la cita a la Clínica de Atención al Niño Diabético del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con un ayuno como mínimo de 12 horas (deberá cenar el día anterior a las 19:00 horas, posteriormente sólo podrá ingerir agua simple).

El día de la cita, se tomará una muestra de glucemia capilar que consiste en dar un piquete en una de las yemas de los dedos y colocarla en un aparato que mide la cantidad de glucosa (azúcar) en la sangre. Posteriormente se obtendrá una muestra de sangre de su antebrazo con un volumen total de 20mL para la determinación de exámenes de laboratorio.

En caso de que usted no sea diabético y haya tenido un nivel de glucosa <126 mg/dL en la muestra de sangre de la yema de su dedo, se procederá a realizar la prueba de tolerancia a la glucosa, la cual consiste en que usted beba un agua dulce y dos horas después se tome una segunda muestra de sangre de 2mL.

Durante el tiempo de espera entre la toma de las muestras, será valorado por un endocrinólogo pediatra quien realizará una historia clínica que consiste en un interrogatorio sobre sus antecedentes médicos y una exploración física.

Al final de la visita se les prestará un aparato llamado podómetro que consta de un dispositivo del tamaño de un radio localizador que usarán cada uno de los integrantes de la familia durante tres días debiendo ser uno de ellos en fin de semana. Deberán de regresar el dispositivo en la segunda visita para que sea utilizado por otras familias.

Visita 2

En esta cita se les solicitará que acudan con ropa cómoda, zapato bajo o tenis. Se les aplicará una prueba para medir su condición física la cual consiste en que suban y bajen un escalón de 30.5cm de altura a una velocidad de 30 veces por minuto durante 5 minutos. Antes y durante tres minutos posteriores a la prueba se medirán los latidos de su corazón.

Se les solicitará que contesten unos cuestionarios sobre hábitos de alimentación y actividad física.

Se les entregarán por escrito un resumen de la valoración realizada, así como de los resultados de laboratorio (glucosa, perfil de lípidos, ácido úrico, insulina, péptido C, transaminasas y proteína C reactiva). Así mismo recibirá las recomendaciones para disminuir el riesgo de desarrollar diabetes y en caso de requerirlo serán referidos al servicio de salud correspondiente.

Los riesgos de este estudio surgen de la necesidad de obtener muestras de sangre. Las punciones venosas pueden causar dolor y posiblemente moretones. La extracción de muestras de sangre puede causar ligero mareo que puede remediarse con bajar la cabeza y alzar las piernas. Puede haber varios beneficios para usted y su familia por su participación con este estudio. La identificación de alguna alteración en la glucosa, grasas de la sangre y presión arterial entre otras, nos permitirá valorar el inicio de tratamiento para controlar y evitar que sigan evolucionando esas alteraciones. Por participar en este estudio usted y su familia no recibirán ninguna compensación monetaria.

Durante el estudio, el médico responsable del mismo responderá a cualquier duda que usted o su hijo tengan acerca del procedimiento, los riesgos y beneficios, así como los resultados del estudio. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y una vez aceptada su participación, ésta se puede cancelar en cualquier momento sin que por ello se afecte la atención de usted o su familia en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Por medio de la presente, aceptamos en forma voluntaria que nuestra familia participe en el estudio de investigación. Hemos leído de forma cuidadosa este documento y entendemos todo lo que implica, además se nos ha asegurado que las muestras de sangre que se tomen serán utilizadas únicamente con los fines propuestos en esta investigación y que los resultados nos serán notificados y serán totalmente confidenciales. En caso de que el paciente y/o el tutor no sepan escribir se colocará la huella digital.

ACEPTAMOS: _____ **SÍ** _____ **NO**

Nombre y firma del padre

Nombre firma de la madre

Nombre y firma del hijo (1)

Nombre firma del hijo (2)

Nombre y firma del hijo (3)

Nombre firma del hijo (4)

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Dirección: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del investigador responsable
Dra. América Liliana Miranda Lora
Subdirección de investigación
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Dr. Márquez # 162. Col. Doctores. CP 06720. México DF.
Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 3009

Fecha: _____

Anexo 3. Carta de asentimiento



Polimorfismos de un solo nucleótido asociados con diabetes mellitus tipo 2 en familias de niños y adolescentes mexicanos.

Estamos realizando un estudio de investigación en familias mexicanas para evaluar el riesgo de tener diabetes mellitus tipo 2. El realizar estudios de investigación es una forma de aprender más sobre las enfermedades. Te estamos invitando a participar en este proyecto para evaluar la condición actual de tu enfermedad en caso de que ya tengas diabetes y en caso de que no seas diabético, se valorará el riesgo que tienes de presentar la enfermedad.

Si decides participar en el estudio, deberás asistir para que se te tomen muestras de sangre en ayuno en la primera cita. Se te picará la yema de tu dedo con una aguja pequeña y se pondrá una gota de tu sangre en un aparato que mide la glucosa (azúcar). Posteriormente se tomará una muestra de sangre de tu brazo. En caso de que no seas diabético, se te dará a beber una bebida azucarada y se te tomará otra muestra de sangre a los 120 min. Además serás valorado por un médico para que contestes algunas preguntas acerca de tus antecedentes de salud. El médico te realizará un examen físico y medirá tu peso, estatura, presión arterial y cintura. Una vez finalizada la primera cita se les prestará a tí y a tu familia un aparato que cuenta pasos y que deberás llevar contigo durante 3 días.

Se te citará nuevamente en otro día en donde contestarás unos cuestionarios sobre tu alimentación y tus actividades. Además se te aplicará una prueba para medir tu condición física que consiste en que subas y bajes un escalón durante 5 minutos mientras nosotros medimos los latidos de tu corazón. Al final de esta visita tus papás y tú recibirán los resultados de las pruebas que se te realizaron.

Los riesgos de este estudio están dados porque se necesita tomar muestras de sangre, lo cual puede ser doloroso o causarte moretones. Este estudio nos proporcionará más conocimientos acerca de la diabetes mellitus en niños, los cuales podemos utilizar para transmitirlos a otros médicos y ayudar a otros niños para prevenir que padezcan esta enfermedad. Además, si encontramos alguna alteración en el azúcar o en las grasas de tu sangre, recibirás el tratamiento adecuado para controlar y evitar que sigan evolucionando esas alteraciones.

Cuando hayamos terminado el estudio escribiremos un reporte sobre los resultados y lo que hemos aprendido. En este reporte no aparecerá tu nombre y nadie sabrá que participaste en el estudio. Puedes preguntar todas las dudas que tengas en cualquier momento y eres libre de participar o no según sea tu deseo, nosotros seguiremos dándote la atención. Si decides participar en el estudio escribe tu nombre y firma.

Estoy de acuerdo en participar: Sí _____ No _____

Nombre con letra de molde: _____

Firma: _____

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Dirección: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del investigador responsable

Fecha: _____

Dra. América Liliana Miranda Lora. Subdirección de investigación. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dr. Márquez # 162. Col. Doctores. CP 06720. México DF. Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 3009

Anexo 4. Consentimiento informado para la realización de estudio genético.



Título del estudio: Polimorfismos de un solo nucleótido asociados con diabetes mellitus tipo 2 en familias de niños y adolescentes mexicanos.

Se solicita la participación de usted y su familia en este proyecto de investigación cuyo objetivo principal es profundizar en el conocimiento de factores genéticos que puedan predisponer al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Esta enfermedad se caracteriza por presentar elevación de los niveles de glucosa (azúcar) en sangre debido a defectos en la acción o secreción de la insulina y que puede favorecer la aparición de complicaciones crónicas que repercuten en una disminución de la calidad de vida de las personas afectadas.

En este estudio participan los Departamentos de Salud Comunitaria y Endocrinología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS. Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores genéticos relacionados con la diabetes mellitus tipo 2 en población mexicana, podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y contribuir a un mejor conocimiento y prevención de esta enfermedad. La participación de usted y su familia es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que su familia precise y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Si usted decide participar, se le extraerá un tubo de sangre de 5ml para obtener las muestras de ADN. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de “genes” que determina sus características físicas personales como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no.

La toma de muestras de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma y en ocasiones un ligero mareo.

Se le solicita su consentimiento para que con las muestras de sangre de usted y su familia, se hagan los procedimientos especificados en los siguientes puntos:

- I. Que en el ADN de su sangre se estudien los genes que pueden estar involucrados en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2.
- II. Es probable que en un futuro se descubran nuevos genes relacionados con la diabetes mellitus tipo 2, por ello se le solicita que autorice almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes importantes implicados en la diabetes mellitus tipo 2, no se realizarán otros estudios con ella.
- III. Usted puede también aceptar que en dicha muestra se realicen estudios genéticos de otras enfermedades diferentes.

Usted puede aceptar que sólo se estudien en su muestra de sangre los genes expresados en el punto I, o las propuestas de los puntos II y III. Si usted acepta sólo los estudios genéticos descritos en el punto I, su muestra se destruirá después de completar la prueba. Si usted acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en los puntos II y III, el investigador garantizará que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no quede más ADN. Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético acepta y firmando este documento, antes de la obtención del ADN.

Yo como representante de mi familia, declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto que mi familia, participe en este estudio genético.

Se me ha entregado una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y todas fueron respondidas a mi entera satisfacción. Sé que se mantendrá en secreto nuestra identidad y que se identificarán las muestras de sangre y de ADN con un número codificado.

Somos libres de retirarnos del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre nuestro tratamiento médico. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.

Entiendo que el objetivo del estudio genético es evaluar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y que los resultados del mismo no se comunicarán ni a mí ni a mi médico, excepto en el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para la salud de los participantes y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud.

Aceptamos ____ No aceptamos ____ que se realicen los estudios genéticos referentes al punto I.

Aceptamos ____ No aceptamos ____ que se guarden las muestras de ADN para pruebas en el futuro en relación a la diabetes mellitus tipo 2 (punto II).

Aceptamos ____ No aceptamos ____ que se guarden las muestras de ADN para realizar estudios futuros de otras enfermedades (punto III).

Consentimos en participar voluntariamente en el(los) apartado(s) marcado(s) de este estudio genético.

Nombre y firma del padre

Nombre firma de la madre

Nombre y firma del hijo (1)

Nombre firma del hijo (2)

Nombre y firma del hijo (3)

Nombre firma del hijo (4)

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Dirección: _____

Dirección: _____

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus apartados, riesgos y beneficios potenciales y la familia consiente en participar por medio de sus firmas.

Fecha: _____

Nombre y firma del investigador responsable

Dra. América Lilitiana Miranda Lora. Subdirección de investigación. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dr. Márquez # 162. Col. Doctores. CP 06720. México DF. Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 3009

Anexo 5. Formato de Identificación y antecedentes.

Polimorfismos genéticos relacionados con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en niños y adolescentes.

FECHA: |_|_|/|_|_|/|_|_|

Registro hospitalario: _____

INTEGRANTE	NOMBRE Apellido paterno /apellido materno / nombre(s)	INICIALES	FOLIO	FECHA DE NACIMIENTO (dd/mm/aa)	NIVEL ESCOLAR	AÑOS DEL ÚLTIMO GRADO ESCOLAR	OCUPACIÓN
					1. Analfabeta 2. Primaria 3. Secundaria 4. Bachillerato o técnico 5. Superior 6. Posgrado		1. Ama de casa 2. Estudiante 3. Oficios 4. Servicios 5. Empleado de fabrica 6. Empleado de oficina 7. Comerciante 8. Profesionista 9. Jubilado 10. Desempleado 11. Otros
Propósito							
Madre							
Padre							
Hermano 1							
Hermano 2							
Hermano 3							
Hermano 4							
Hermano 5							
No familiar							
DATOS PARA ESTABLECER COMUNICACIÓN							
Dirección: (calle, no. Exterior, no. Interior, colonia, delegación/municipio, C.P.)							

Teléfono de casa:	Correo electrónico:
Teléfono celular:	A quién pertenece:
Teléfono del trabajo:	A quién pertenece:
Teléfono de algún familiar o vecino:	A quién pertenece:

ANTECEDENTES FAMILIARES

INTEGRANTE	FOLIO	EDAD (años cumplidos)	SEXO 1.Masculino 2.Femenino	NACIO-NALIDAD 1. Mexicana 2. Otra 3. No sabe	ENTIDAD FED. Tres letras iniciales del estado	ESTADO ACTUAL 1. Vivo 2. Muerto 3. No sabe	CAUSA DE MUERTE (Anotar NA en los vivos)	0. NO 1.SÍ 9. No sabe							
								OBESIDAD	DT2	HAS	DISLIPIDEMIA	OTRAS	ESPECIFICAR		
Madre															
Abuela materna	No aplica														
Abuelo materno	No aplica														
Tío materno 1	No aplica														
Tío materno 2	No aplica														
Tío materno 3	No aplica														
Tío materno 4	No aplica														
Tío materno 5	No aplica														
Padre															
Abuela paterna	No aplica														
Abuelo paterno	No aplica														
Tío paterno 1	No aplica														
Tío paterno 2	No aplica														
Tío paterno 3	No aplica														
Tío paterno 4	No aplica														
Tío paterno 5	No aplica														
Propósito															
Hermano 1															
Hermano 2															
Hermano 3															
Hermano 4															

INTEGRANTE	FOLIO	EDAD (años cumplidos)	SEXO 1.Masculino 2.Femenino	NACIO-NALIDAD 1. Mexicana 2. Otra 3. No sabe	ENTIDAD FED. Tres letras iniciales del estado	ESTADO ACTUAL 1. Vivo 2. Muerto 3. No sabe	CAUSA DE MUERTE (Anotar NA en los vivos)	0. NO 1. Sí 9. No sabe							
								OBESIDAD	DT2	HAS	DISLIPIDEMIA	OTRAS	ESPECIFICAR		
Hermano 5															

ANTECEDENTES PERINATALES

INTEGRANTE	FOLIO	Peso nacimiento (g)	Edad gestacional (semanas)	Exposición a diabetes gestacional 0. No 1. Sí	Exposición a preeclampsia o eclampsia 0. No 1. Sí	Tiempo de alimentación con leche materna (meses)	Edad de ablactación (meses)
Propósito							
Hermano 1							
Hermano 2							
Hermano 3							
Hermano 4							
Hermano 5							

VARIABLES SOCIOECONÓMICAS

Ingreso familiar mensual	
Gasto mensual en comida	
Familia nuclear (Sí o No)	
Jefe de familia	

ANTECEDENTES DE LOS PACIENTES CON DIABETES MELLITUS

INTEGRANTE	FOLIO	Edad del diagnóstico (años)	Debut al diagnóstico 1. Clínico 2. Laboratorio 3. CAD	Peso previo al diagnóstico (kg)	Glucosa al diagnóstico (mg/dL)	SÍNTOMAS AL DIAGNÓSTICO 0. No 1. Sí						TRATAMIENTO ACTUAL 0. No 1. Sí					
						Poliuria	Polidipsia	Polfagia	Pérdida de peso	Fatiga	Perdida de peso	Asintomático	Insulina	Metformina	Sulfonilureas	Glitazonas	Incretinas
Propósito																	
Madre																	
Padre																	
Hermano 1																	
Hermano 2																	
Hermano 3																	
Hermano 4																	
Hermano 5																	

NOMBRE DEL ENCUESTADOR: _____

Anexo 6. Exploración física y prueba de Harvard.

Polimorfismos genéticos relacionados con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en niños y adolescentes

FECHA: |_|_|/|_|_|/|_|_| Registro hospitalario: _____

INTEGRANTE	Folio	Glucosa capilar (mg/dL)	Peso (Kg)	Talla (cm)	Cintura (cm)	PAS1 (mmHg)	PAD1 (mmHg)	PAS2 (mmHg)	PAD2 (mmHg)	PAS3 (mmHg)	PAD3 (mmHg)
Propósito											
Madre											
Padre											
Hermano 1											
Hermano 2											
Hermano 3											
Hermano 4											
Hermano 5											
No familiar											

INTEGRANTE	FOLIO	Tanner Genital	Tanner mamario	Tanner púbico	Acantosis en cuello 0. No 1. Si	FC basal	FC inmediata	FC 1 min	FC 2 min	FC 3 min	Duración (segundos)
Propósito											
Madre		No aplica									
Padre		No aplica									
Hermano 1											
Hermano 2											
Hermano 3											
Hermano 4											
Hermano 5											
No familiar											

NOMBRE DE QUIEN REALIZÓ LAS OBSERVACIONES:

Anexo 7. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

						Folio: _____		
Frecuencia de consumo de alimentos								
						Fecha: día ____ / mes ____ / año ____		
INSTRUCCIONES.								
Llene cuidadosamente este formato, siguiendo las instrucciones que se piden en cada columna. Escriba con la mayor claridad posible.								
Nombre: _____								
ALIMENTO	Frecuencia de consumo					Cantidad consumida por el niño		
	No lo consume	Nº de veces por			Total de unidades	Unidad de Medida (pieza, vaso, plato, cuchara, taza, etc.)	Tamaño Chico, mediano, grande	
		Mes	Semana	Día				
Productos Lácteos								
1	Leche entera (líquida o polvo)							
2	Leche semidescremada (líquida o polvo)							
3	Leche descremada (líquida o polvo)							
4	Leche saborizada (líquida o polvo)							
5	Quesos blancos (panela, ranchero)							
6	Quesos maduros (manchego, gouda)							
7	Yakult o chamito							
8	Yogurt o soful natural							
9	Yogurt o soful de sabores							
10	Danonino							
Cereales								
11	Avena							
12	Tortilla de maíz							
13	Tortilla de harina de trigo							
14	Pan de caja (blanco o integral)							
15	Bolillo (blanco o integral)							
16	Pan dulce							
17	Galletas dulces (canelitas, polvorones)							
18	Galletas tipo sandwich (emperador, cremas de nieve)							
19	Galletas simples (marías, habaneras, animalitos)							
20	Galletas saladas							
21	Arroz							
22	Sopa de pasta							
23	Sopa maruchan							
24	Pastas							
25	Papa natural o en polvo (sopa, pure ó cocida)							
26	Elote o esquites							
27	Amaranto (alegría)							
28	Cereal de caja							
	(anote nombre y marca)							

ALIMENTO	Frecuencia de consumo					Cantidad consumida por el niño			
	No lo consume	Nº de veces por			Total de unidades	Unidad de Medida (pieza, vaso, plato, cuchara, taza, etc.)	Tamaño Chico, mediano, grande		
		Mes	Semana	Día					
Frutas									
29	Jugos naturales de frutas								
30	Fruta fresca								
31	Fruta en almibar								
32	Otras frutas (seca, cristalizada)								
Verduras									
33	Jugos naturales de verduras								
34	Verduras de hoja verde (lechuga, espinacas, acelgas)								
35	Verduras rojas (jitomate, rábano, pimiento)								
36	Verduras verdes (chicharo, ejote, calabaza)								
37	Verduras amarillas (zanahoria, elote, camote)								
Huevo, Carnes, Pescado, Mariscos y Embutidos									
38	Huevo								
39	Pollo								
40	Carne blanca (pollo, pavo)								
41	Carne roja (res, borrego, cerdo)								
42	Embutidos (salchicha, jamón)								
43	Chorizo, longaniza								
44	Vísceras (hígado, corazón, panza)								
45	Chicharrón (frito, prensado)								
46	Pescado fresco								
47	Pescado en lata								
48	Mariscos (ostión, camarón, pulpo)								
Leguminosas									
49	Frijoles								
50	Frijoles de lata								
51	Lentejas								
52	Habas								
53	Garbanzo								
54	Soya								
55	Alubias								
Azúcares y golosinas									
56	Gelatina								
57	Pasteles								
58	Helado y paletas de leche								
59	Miel (abeja, maple)								
60	Mermelada								
61	Cajeta								
62	Flan								
63	Pay								

ALIMENTO	Frecuencia de consumo					Cantidad consumida por el niño		
	No lo consume	Nº de veces por			Total de unidades	Unidad de Medida (pieza, vaso, plato, cuchara, taza, etc.)	Tamaño Chico, mediano, grande	
		Mes	Semana	Día				
64	Chocolate (cualquiera)							
65	Crema de cacahuete (aladino)							
66	Dulces (caramelos, paletas)							
67	Ate							
68	Congeladas y paletas de agua							
Grasas y Aceites								
69	Margarina							
70	Mantequilla							
71	Crema o Nata							
72	Mayonesa							
73	Aceite de olivo							
Frituras								
74	Frituras (papas, palomitas, chicharrones)							
75	Cacahuates procesados							
Comida rápida internacional								
76	Papas a la francesa							
77	Pizza							
78	Hot Dogs							
79	Hamburguesas							
80	Banderillas							
81	Baguette							
Comida rápida mexicana								
82	Sincronizadas							
83	Tortas							
84	Torta de Tamal							
85	Tamal							
86	Tamal frito							
87	Gorditas de chicharrón							
88	Tlacoyo							
89	Quesadillas							
90	Sopes							
91	Tacos							
92	Pozole							
93	Pancita							
94	Birria							
Semillas								
95	Nueces							
96	Almendras							
97	Avellanas							
98	Cacahuete natural							
99	Pepitas							
100	Pistaches							
Bebidas								
101	Refresco cualquier marca							
102	Refrescos y bebidas dietéticas							

Anexo 8. Cuestionario de actividad física.

Folio: _____				
EJERCICIO Y SEDENTARISMO				
Nombre del paciente: _____			Fecha: día __ __ mes __ __ año __ __	
INSTRUCCIONES. Responda las preguntas tachando o anotando la opción de respuesta. No escriba en la columna sombreada				
ACTIVIDADES SEDENTARIAS				NO ESCRIBA EN ESTA COLUMNA
1	¿Cuántas televisiones hay en tu casa?	Número __	1	__
2	¿Tienes televisor en tu recámara?	1. Si. 2. No.	2	__
3	¿Regularmente cuántas horas al día pasas viendo televisión (programación, películas), incluyendo el tiempo por la mañana, tarde y noche?	h/día __ __ . __ __	3	__ __ . __ __
4	¿Tienes computadora en tu casa?	1. Si. 2. No.	4	__
5	¿Independientemente de que tengas o no computadora en tu casa, regularmente cuántas horas al día utilizas la computadora?	h/día __ __ . __ __	5	__ __ . __ __
6	En tu casa, ¿tienes videojuegos (X box, game-boy, wii, juegos en computadora)?	1. Si. 2. No.	6	__
7	¿Independientemente de que tengas o no videojuegos en tu casa, regularmente cuántas horas al día dedicas a los videojuegos (X-box, nintendo, maquinatas, computadora, celular)?	h/día __ __ . __ __	7	__ __ . __ __
8	En tu casa, ¿tienes reproductor de DVD y/o Blue Ray?	1. Si. 2. No.	8	__
9	¿Regularmente, cuántas horas pasas al día sentado (leyendo, oyendo música, haciendo la tarea, jugando juegos de mesa)?	h/día __ __ . __ __	9	__ __ . __ __
10a	¿Comes algo cuando estás frente a la TV, computadora o videojuegos?	1. Si. 2. No.	10	a. __
10b	1. Siempre 2. Frecuentemente 3. Ocasionalmente 4. No aplica			b. __
11a	¿Bebes algo cuando estas frente a una pantalla (TV, computadora o videojuegos)?	1. Si. 2. No.	11	a. __
11b	1. Siempre 2. Frecuentemente 3. Ocasionalmente 4. No aplica			b. __
12	¿Entre semana, regularmente a que hora te duermes?	__ __ . __ __ pm	12	__ __ . __ __
13	¿Entre semana, regularmente a que hora te despiertas?	__ __ . __ __ am	13	__ __ . __ __
14	¿Regularmente cuántas horas duermes de siesta?	h/día __ . __ __	14	__ . __ __
15	¿Regularmente cuantas horas al día vas a la escuela o al trabajo?	h/día __ __ . __ __ No trabaja/escuela __ . __ __	15	__ __ . __ __
16	¿Regularmente cuánto tiempo empleas en transportarte de tu casa a la escuela/trabajo, de ida y regreso (sumar los tiempos)?	h/día __ . __ __ No aplica __ . __ __	16	__ . __ __
17	¿Regularmente cómo te transportas de tu casa a la escuela/trabajo, de ida y de regreso (Anotar en orden de importancia, poner a la derecha el orden)?	1. Caminando 2. Bicicleta 3. Automóvil 4. Autobús o equivalente 5. Metro o equivalente 6. No aplica	17	a __ b __ c __
EJERCICIO EN LA ESCUELA (entre semana)(aplicar sólo a los niños)				
18	¿Cuántos días de la semana tienes clase de educación física en la escuela?	días __ No aplica __	18	__
19	¿Cuánto tiempo dura tu clase?	h __ . __ __ No aplica __ . __ __	19	__ . __ __
20	¿Tienes maestro de educación física?	1. Si. 2. No. No aplica __	20	__



Anexo 9. Artículo publicado

A Genetic Risk Score Improves the Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus in Mexican Youths but Has Lower Predictive Utility Compared With Non-Genetic Factors

OPEN ACCESS

América Liliana Miranda-Lora¹, Jenny Vilchis-Gil¹, Daniel B. Juárez-Comboni², Miguel Cruz³ and Miguel Klünder-Klünder^{4*}

Edited by:

Gong Chunxiu,
Capital Medical University, China

Reviewed by:

Sheela N. Magge,
Johns Hopkins Medicine,
United States
George Paltoglou,
National and Kapodistrian University of
Athens, Greece

*Correspondence:

Miguel Klünder-Klünder
klunderk@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Pediatric Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 30 December 2020

Accepted: 18 February 2021

Published: 12 March 2021

Citation:

Miranda-Lora AL, Vilchis-Gil J, Juárez-Comboni DB, Cruz M and Klünder-Klünder M (2021) A Genetic Risk Score Improves the Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus in Mexican Youths but Has Lower Predictive Utility Compared With Non-Genetic Factors. *Front. Endocrinol.* 12:647864. doi: 10.3389/fendo.2021.647864

¹ Epidemiological Research Unit in Endocrinology and Nutrition, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ² Pediatric Medical Residency, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ³ Medical Research Unit in Biochemistry, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, ⁴ Research Subdirectorate, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico

Background: Type 2 diabetes (T2D) is a multifactorial disease caused by a complex interplay between environmental risk factors and genetic predisposition. To date, a total of 10 single nucleotide polymorphism (SNPs) have been associated with pediatric-onset T2D in Mexicans, with a small individual effect size. A genetic risk score (GRS) that combines these SNPs could serve as a predictor of the risk for pediatric-onset T2D.

Objective: To assess the clinical utility of a GRS that combines 10 SNPs to improve risk prediction of pediatric-onset T2D in Mexicans.

Methods: This case-control study included 97 individuals with pediatric-onset T2D and 84 controls below 18 years old without T2D. Information regarding family history of T2D, demographics, perinatal risk factors, anthropometric measurements, biochemical variables, lifestyle, and fitness scores were then obtained. Moreover, 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with pediatric-onset T2D in Mexicans were genotyped. The GRS was calculated by summing the 10 risk alleles. Pediatric-onset T2D risk variance was assessed using multivariable logistic regression models and the area under the receiver operating characteristic curve (AUC).

Results: The body mass index Z-score (Z-BMI) [odds ratio (OR) = 1.7; p = 0.009] and maternal history of T2D (OR = 7.1; p < 0.001) were found to be independently associated with pediatric-onset T2D. No association with other clinical risk factors was observed. The GRS also showed a significant association with pediatric-onset T2D (OR = 1.3 per risk allele; p = 0.006). The GRS, clinical risk factors, and GRS plus clinical risk factors had an AUC of 0.66 (95% CI 0.56–0.75), 0.72 (95% CI 0.62–0.81), and 0.78 (95% CI 0.70–0.87), respectively (p < 0.01).

Conclusion: The GRS based on 10 SNPs was associated with pediatric-onset T2D in Mexicans and improved its prediction with modest significance. However, clinical factors .

such the Z-BMI and family history of T2D, continue to have the highest predictive utility in this population.

Keywords: type 2 diabetes, children, youth, genetic risk score, risk factors, obesity, body mass index

INTRODUCTION

The prevalence of type 2 diabetes (T2D) throughout Mexico in 2018 was 10.3%, one of the highest globally and rising (1). Although information regarding the national prevalence of pediatric-onset T2D remains unavailable, an increasing proportion of younger individuals have been affected with more aggressive phenotypes nowadays (2–4).

T2D is a multifactorial disease caused by a complex interplay between genetic and environmental risk factors. Multiple non-genetic risk factors have been associated with T2D, including age, perinatal risk factors, ethnicity, family history, low socioeconomic status, obesity, metabolic syndrome components, and unhealthy lifestyle behaviors (5–7). However, genetics has been hypothesized to play a much greater role in the development of T2D among the younger populations (8).

Although genome-wide association and candidate gene studies have identified hundreds of single nucleotide polymorphism (SNPs) associated with T2D, these variants still only explain less than 20% of the disease's heritability (9–12). While most of the identified SNPs have been associated with relatively low risk for T2D, combining several markers together through a genetic risk score (GRS) may indicate higher risk (13–22).

Some authors have reported that a high GRS was associated with a younger age at T2D diagnosis (23, 24). However, insufficient information has been available regarding whether genetic information improves prediction models for pediatric-onset T2D. Our estimates have shown that pediatric-onset T2D had a heritability of 50% among Mexicans (25). Endeavoring to elucidate this genetic predisposition, our research team has identified 10 SNPs associated with pediatric-onset T2D among Mexicans with low individual risk [odds ratio (OR) between 1.4 and 2.2] (23, 26, 27). Integrating these genetic factors into a GRS to be used in conjunction with classical risk factors for T2D could be a useful approach toward improving prediction models for the disease (12, 14–16, 28).

Given the importance of identifying risk factors for the early development of T2D on its prevention, genetic information could conceivably help identify individuals at high risk for pediatric-onset T2D. The current study therefore sought to evaluate the predictive utility of incorporating a GRS comprising 10 SNPs into a model with clinical risk factors for pediatric-onset T2D among Mexicans.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

This case-control study was conducted at the Children's Hospital Federico Gómez, Mexico.

Participants

Patients aged between 8 and 18 years who lived in Mexico City's metropolitan area, had the last three family generations born in Mexico, and had genetic mosaic proportions of 65% Native American, 30% European, and 5% African were included (29–31).

Cases included participants under 18 years of age who were diagnosed with T2D for less than 1 month according to the following criteria: (a) previous diagnosis and/or oral glucose tolerance test (OGTT) according to the American Diabetes Association criteria (32); (b) absence of anti-glutamic acid decarboxylase and anti-insulin antibodies; (c) no clinical features of maturity-onset diabetes among younger participants; and (d) C-peptide ≥ 0.45 ng/ml.

Controls were recruited by requesting the participation of friends or neighbors who were of similar age and sex but had no family relationship with the index cases (population controls). Control participants were characterized as non-T2D through the OGTT. We excluded participants with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance.

Enrolled participants provided written assent in addition to written consent from their parents. This study had been approved by the local ethics, biosafety, and research committees.

Clinical Risk Factors

Information regarding demographics and medical history from family pedigrees over three generations were obtained from questionnaires provided by trained research technicians. All participants were asked to answer questions regarding any case of diabetes in their family, relatives age at diagnosis, and treatment and type of diabetes. T2D diagnosis among the parents were corroborated through an OGTT in those with no previous history of T2D. Information regarding birthweight, gestational age, gestational diabetes exposure, and breastfeeding onset and duration were corroborated with information obtained from in the newborn sheet.

Diet was assessed using an adapted version of the semi-quantitative food frequency intake questionnaire from the previous month. As support material, the interviewer used food replicas to standardize the types and amounts of the main food groups consumed by the participants. The questionnaire contained 119 food items classified into 13 groups. Participants' food intake per day was estimated, after which the amount food consumed was measured in terms of units (e.g., piece, cup, plate, or spoon) and size (i.e., small, medium, or large). For analysis, consumption frequencies were calculated in grams or milliliters ingested per day for each food item. Energy and macronutrient intake was determined using the Food Processor software (version 10.10, 2012, ESHA Research Inc, Salem, OR), which includes Mexican foods (33). Percentages of adequate energy and

macronutrient intake were calculated using recommendations for the Mexican population.

Physical activity was assessed using a physical activity questionnaire, which assessed intensity, frequency, and duration of the physical activities over 1 week. Standard procedures were performed using continuous scales of weekly energy expenditure expressed in metabolic equivalents (MET) \times min/day (34).

Fitness was evaluated using a modified Harvard step test, which consisted of stepping onto and off (both feet) a stool 30 cm high, 42 cm wide, and 38 deep for 5 min at 30 cycles per min. Heart rates were recorded at 0, 1, and 2 min after participants finished or prematurely stopped the exercise. The physical fitness score was calculated from the total number seconds the exercise was performed multiplied by 100 and divided by the sum of the 3 heart rate values (35).

Clinical and Biochemical Variables

Anthropometric data were collected using standard methods. Body height and weight were measured using a column scale with a stadiometer. Weight was determined using a digital scale (Seca[®] 884, Hamburg, Germany) with an accuracy of 0.1 kg, while height was determined using a stadiometer (Seca[®] 225, Hamburg, Germany) with a precision of 0.1 cm. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters, after which the BMI Z-score (Z-BMI) was calculated according to age and sex, taking the 2007 WHO data as reference (35). Waist circumference (WC) was measured at the midpoint between the lower costal border and the iliac crest during the end of exhalation using a non-elastic flexible tape to the nearest 0.1 cm (Seca[®] 200) in a standing position.

Blood samples were drawn after an overnight fast to measure glucose (hexokinase method Dimension RXL.MAX, Siemens), insulin (chemiluminescence IMMULITE 1000, Siemens, Euro, DPC, Llanberis, UK), C-peptide (chemiluminescence IMMULITE 1000, Siemens, Euro, DPC, Llanberis, UK), and hemoglobin A1c (Dimension R XL.MAX Siemens immunoassay). Participants without diabetes underwent an OGTT with 1.75 g/kg of anhydrous glucose (up to 75 g), with glucose and insulin being measured 2 h after glucose administration. To evaluate insulin resistance, the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was

calculated using the following formula: HOMA-IR = fasting insulin (mU/mL) \times fasting glucose (mg/dl)/405 (36).

Genotyping

SNPs were selected considering previously published data suggest their association with pediatric-onset T2D in Mexicans (Table 1). DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using commercial kits following the manufacturer's instructions (QIAmp96 DNA Blood, Mini/Kit, Qiagen, Germany). Purity and concentration were assessed through spectrophotometry at 260/280 nm (Epoch spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), and the integrity was checked following 0.8% agarose gel electrophoresis. SNPs were genotyped using the TaqMan[®] OpenArray[®] system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical Analysis

Demographic and clinical characteristics of the participants were examined. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation, whereas categorical variables were expressed as numbers and percentages. Bivariate analyses were performed using Student's t-test, the Mann-Whitney U, or the Chi-square test according to the type and distribution of the variable.

Allelic and genotypic frequencies were determined, after which genotype distribution was confirmed from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Associations between individual SNPs and pediatric-onset T2D were analyzed using logistic regression adjusting for age, gender, and Z-BMI with Bonferroni correction for multiple comparison ($p < 0.05$).

To examine the cumulative effect of the SNPs, an unweighted GR was computed. Each participant was assigned 0, 1, or 2 points according to the number of risk alleles for each SNP. The GRS was then constructed by summing the number of risk alleles, assuming an additive genetic model and equal contribution of each SNP to pediatric-onset T2D. Student's t-tests were used to compare the GR distribution between groups.

Pediatric-onset T2D risk variance was assessed using multivariable logistic regression models and evaluated McFadden's pseudo R^2 . To develop the best prediction model for pediatric-onset T2D, univariable analysis for each independent variable was performed, subsequently selecting those with a p value < 0.1 as candidate predictors for the

TABLE 1 | List of the 10 single nucleotide polymorphism considered in the genetic risk score computation.

Reported gene	SNP	Functional class	Alleles	MAF (%) Mexicans	MAF (%) 1000 GP (37)	OR	95% CI	p	Reference
<i>SLC16A11</i>	rs13342232	synonymous	A/G	41.6	16.3	1.9	1.2-3.0	0.003	(26)
<i>ADORA1</i>	rs903361	intergenic	A/G	27.8	37.7	1.9	1.2-3.0	0.010	(27)
<i>CADM2</i>	rs13078807	intron	A/G	9.3	8.7	2.2	1.2-4.0	0.009	(27)
<i>GNPDA2</i>	rs10938397	intergenic	A/G	32.5	32.6	2.2	1.4-3.7	9.0E-4	(27)
<i>VEGFA</i>	rs6905288	downstream	G/A	35.5	35.5	1.4	1.1-2.1	0.044	(27)
<i>FTO</i>	rs9939609	intron	T/A	20.6	34.0	1.8	1.0-2.3	0.039	(27)
<i>POC5</i>	rs2112347	upstream	G/T	29.6	48.9	1.7	1.4-2.1	6.9E-4	(23)
<i>RPS10</i>	rs206936	intron	A/G	34.6	35.5	1.5	1.2-1.8	0.005	(23)
<i>GLIS3</i>	rs7034200	intron	A/C	35.5	44.4	2.1	1.8-2.4	1.9E-6	(23)
<i>LINGO</i>	rs10968576	intron	A/G	21.2	20.4	2.0	1.6-2.4	4.3E-4	(23)

SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency; 1000 GP, 1000 genome project; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

TABLE 2 | Clinical characteristics of cases and controls.

Trait	Cases (n = 97)	Controls (n = 83)
Sociodemographic and anthropometrics		
Females n(%)	45 (46.4)	38 (45.2)
Age (years)	12.9 ± 2.6	12.5 ± 2.9
Weight (kg)	64.2 ± 20.3	57.15 ± 21.4*
Height (cm)	157.2 ± 13.3	152.4 ± 14.7*
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 5.3	24.4 ± 6.7
Z-BMI	1.5 ± 0.7	1.0 ± 1.1*
WC (cm)	86.5 ± 15.0	80.2 ± 19.4*
Biochemical traits		
Fasting glucose (mg/dl)	149.6 ± 77.2	89.0 ± 8.5*
2-h glucose (mg/dl)	-	97.4 ± 19.7
HbA1c (%)	9.6 ± 3.4	5.6 ± 0.5*
Insulin (mUI/ml)	15.0 ± 19.6	10.3 ± 9.1*
HOMA-IR	5.2 ± 0.7	2.3 ± 0.3*
C-peptide (ng/dl)	2.4 ± 2.2	2.8 ± 2.3
Family history of T2D		
Mother	39 (57.1)	8 (10.3)*
Father	17 (27.4)	4 (6.9)*
Maternal grandmother	39 (40.6)	17 (21.0)*
Paternal grandmother	37 (42.5)	15 (20.3)*
Paternal grandmother	37 (42.5)	15 (20.3)*
Maternal grandfather	26 (28.0)	18 (23.4)
Paternal grandfather	19 (22.1)	19 (25.7)
Perinatal factors		
Birthweight (kg)	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.5
Gestational age (weeks)	37.9 ± 1.8	37.7 ± 1.8
Exposure to GD n (%)	13 (14.1)	1 (1.3)*
Breastfeeding (months)	9.5 ± 9.8	7.4 ± 5.7
Lifestyle		
kcal/day	1783 ± 910	2316 ± 1152*
% Carbohydrates	54.5 ± 8.1	54.9 ± 8.8
% Lipids	27.2 ± 8.1	30.5 ± 7.2*
Physical activity (METS)	4.2 ± 5.2	2.6 ± 4.6*
Fitness score	72.3 ± 24.7	74.1 ± 23.7

Data are means (SD) or counts (percentages), as appropriate.

*p < 0.05 according to type and distribution of the variable: Student's t test, Mann Whitney U or χ^2 .

BMI, body mass index; Z-BMI, Z-score BMI; WC, waist circumference; GD, gestational diabetes.

multivariable model. A multivariable model was then constructed using the candidate predictors, with <0.05 indicating significance of the collinearity and backward

elimination procedure for the selected predictors. Moreover, age, gender, and fitness score (the unique objective lifestyle

variable) were forced into the final model despite not being significant candidates for the multivariable model. The strength of the association was measured using odd ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). Finally, three models were established: Model 1 comprising only clinical risk factors (age, sex, Z-BMI, maternal diabetes, and fitness score); Model 2 comprising only GRS; and Model 3 comprising only clinical risk factors plus GRS.

The fit of the models was also evaluated using the likelihood ratio test, which compares the difference in area under the receiver operating characteristic curve (AUC) to evaluate the models' ability to predict pediatric-onset T2D. Models for clinical variables with and without GRS were compared using the Chi-squared test. All analyses were performed using STATA SE v11.0 statistical software (STATA Corp, College Station, TX).

RESULTS

A total of 97 cases with pediatric-onset T2D and 83 controls were included, with Table 2 showing the main differences in clinical characteristics between cases and controls. Cases reported more obesity indexes and expectedly higher glucose related traits compared to controls. The proportion of children with a family history of T2D history and exposure to gestational diabetes (GD) was significantly higher among those with pediatric-onset T2D than among controls. Moreover, cases who had already received treatment at the time diagnosis exhibited lower self-reported energy and macronutrient consumption and higher physical activity (METS). However, no difference in fitness scores objectively measured with the modified Harvard step test was noted.

All genotyped SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium and had an effect in the expected direction. The additive logistic regression model adjusted for age, gender, and Z-BMI showed that two SNPs were significantly associated with pediatric-onset

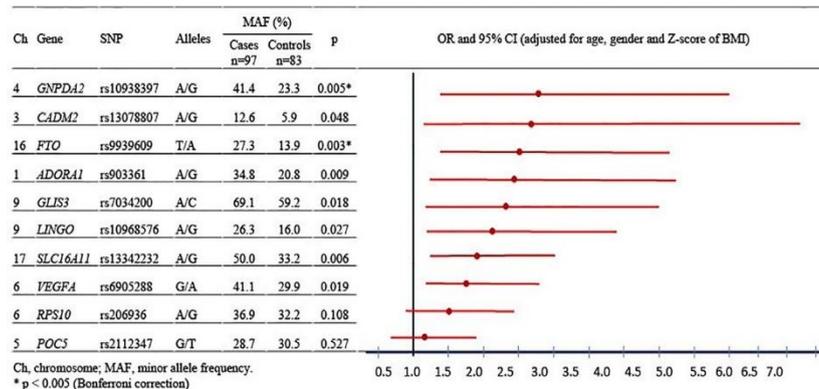


FIGURE 1 | Allele frequency and association between individually single nucleotide polymorphisms and pediatric-onset type 2 diabetes.

T2D after Bonferroni correction, while and six SNPs revealed a nominal association with pediatric-onset T2D, yielding ORs ranging from 1.2 to 2.7 (Figure 1).

To examine the cumulative effects of the SNPs, the GRS were compared between both groups. Accordingly, pediatric-onset T2D cases had a significantly higher mean GRS value than controls (Figure 2).

A multivariable logistic regression model was fitted with all non-genetic factors evaluated. After model reduction, Z-BMI (OR = 1.7; p = 0.009) and maternal history of T2D (OR = 7.1; p < 0.001) were identified as significant and independent clinical predictors of pediatric-onset T2D (Model 1). No association with any other clinical factor was observed. Moreover, Model 2 showed that the GRS was significantly associated with pediatric-onset T2D (OR 1.3 per risk allele; p = 0.006). Finally, Model 3 revealed the same GRS size effect after adjusting for Z-BMI, maternal diabetes, age, gender, and fitness score (Table 3).

The McFadden’s test (Table 3) showed that the model including only clinical variables and only GRS had a pseudo R² of 0.15 and 0.14, respectively. Notably, the model that included clinical variables plus GRS significantly increased the model fit to 0.21 (p < 0.01).

Figure 3 shows the AUC for pediatric-onset T2D according to the three models. Model 3 had a better performance than Model 1, which in turn had a better performance than Model 2 (p = 0.01). The addition of the GRS into the clinical factors increased the AUC by 7 percentage points.

DISCUSSION

Developing prediction models for the identification of individuals at risk for early onset T2D is important in order to establish measures for preventing or delaying disease onset. Recently, several studies have shown that certain SNPs were associated with pediatric-onset T2D (23, 26, 27, 36, 38–40). Given that such SNPs individually have low predictive ability

TABLE 3 | Logistic regression for pediatric-onset type 2 diabetes using clinical risk factors and the genetic risk score as predictors.

	OR	95% CI	p
Model 1 (pseudo R ² = 0.15, p < 0.001)*			
BMI (Z-score)	1.7	1.1 ; 2.5	0.009
Maternal Diabetes	7.1	2.8 ; 17.8	<0.001
Age (years)	1.1	0.9 ; 1.2	0.444
Gender (male)	1.1	0.6 ; 2.3	0.72
Fitness score	0.9	0.9 ; 1.0	0.822
Model 2 (pseudo R ² = 0.14, p < 0.001)			
GRS (per risk allele)	1.3	1.1 ; 1.6	0.006
Model 3 (pseudo R ² = 0.21, p < 0.001)*			
GRS (per risk allele)	1.3	1.0 ; 1.6	0.025
BMI (Z-score)	1.5	0.9 ; 2.4	0.146
Maternal Diabetes	8.5	2.8 ; 26.1	<0.001
Age (years)	1.1	0.9 ; 1.3	0.332
Gender (male)	1.2	0.5 ; 2.9	0.75
Fitness score	1.0	1.0 ; 1.0	0.778

*McFadden’s pseudo R², likelihood ratio p < 0.001.
OR, odds ratio; CI, confidence interval.

for the risk of T2D, the GRS provides an opportunity to evaluate the cumulative effects of genetic factors. Although a previous study had shown that the GRS was associated with younger age at T2D diagnosis (41), to the best of our knowledge, this has been the first study to evaluate the utility of the GRS for predicting pediatric-onset T2D among the Mexican population. Our results are important to determine the utility of genetic factors for identifying susceptible populations in low- to middle-income countries.

The current study found that more than 95% of pediatric-onset T2D cases had six or more risk alleles and a higher mean GRS compared to controls. Although the risk per individual allele was low (OR 1.3, CI95%: 1.1;1.6), combining the markers could indicate great risk. These results are in agreement with the findings of other cross-sectional and follow-up studies wherein different GRSs were associated with T2D-related traits in adults of different ethnic groups (OR 1.06 to 2.2 per risk allele). However, most of the aforementioned studies included tens to

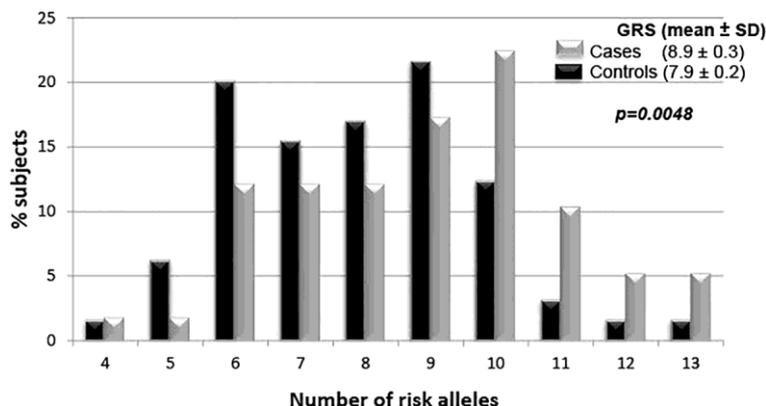


FIGURE 2 | Genetic risk score density of the 10 single nucleotide polymorphisms between cases and controls.

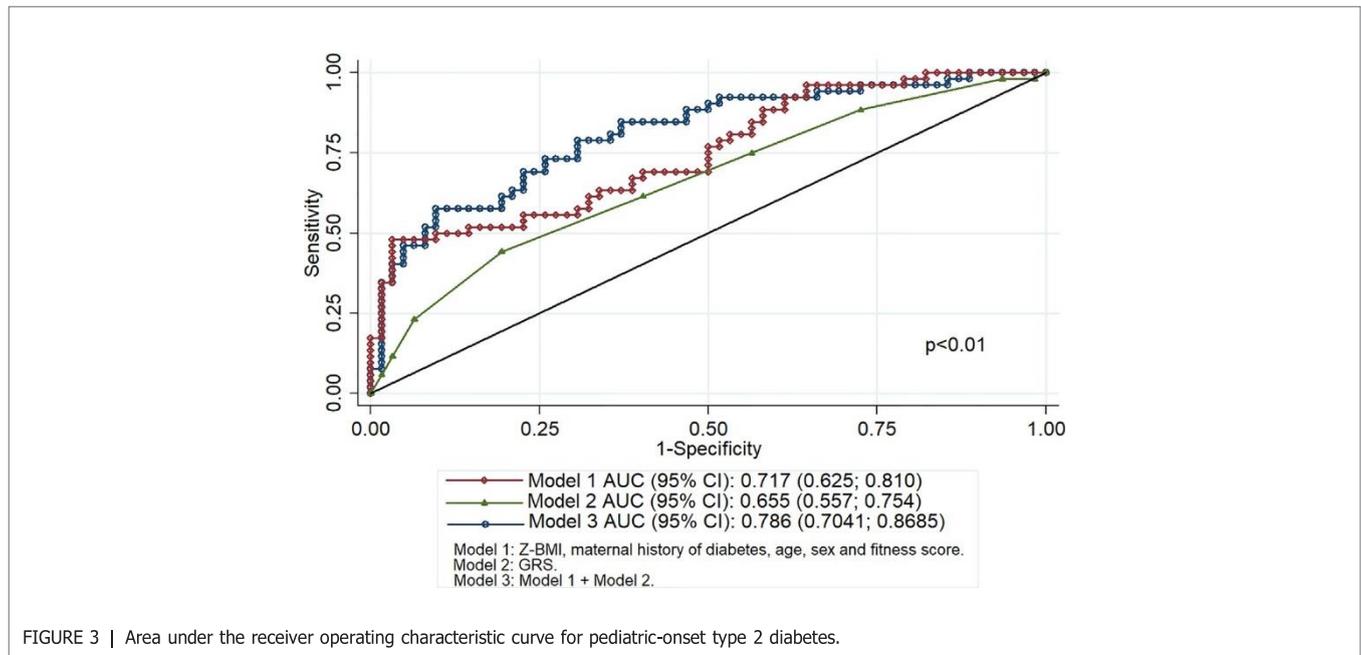


FIGURE 3 | Area under the receiver operating characteristic curve for pediatric-onset type 2 diabetes.

hundreds of susceptibility loci (14–16, 27, 28, 42–53). Taken together, the presented information supports the utility of the GRS in prediction models for T2D independent of environmental risk factors.

The present study determined the utility of GRS in improving risk prediction models. Accordingly, our results showed that the model including only clinical variables (Z-BMI, maternal diabetes, age, gender, and fitness score) had pseudo R^2 value of 15%, whereas incorporating the GRS increased this to 21%. Abdullah et al. previously reported that the inclusion of a GRS promoted an approximately 1%–2% increase in pseudo R^2 (54).

Our findings showed that while the GRS had a lower predictive ability for pediatric-onset T2D compared to clinical factors, combining both factors prompted a modest yet significant increase. The GRS utilized herein had a better AUC (0.66) compared to that employed in previous reports wherein a GRS with <10 SNPs had AUCs ranging from 0.56 to 0.59, a GRS with 10 to 20 SNPs had AUCs of 0.55 to 0.68, and a GRS with >30 SNPs had AUCs from 0.58 to 0.64 (55). On the other hand, conventional risk models that included variables, such as age, sex, BMI, physical activity level, family history of diabetes, ethnicity, smoking status, alcohol consumption, waist circumference, waist-to-hip ratio, and blood pressure, have reported AUCs ranging from 0.63 to 0.96 (21). The aforementioned findings are similar to those presented herein, where an AUC of 0.72 was achieved for the model including Z-BMI, maternal history of T2D, age, sex and fitness score.

Previous studies have reported that the inclusion of genetic markers resulted in a slight improvement, with differences in AUCs ranging from 0 to 0.12 and net reclassification of T2D risk prediction models from –2.2% to 10.2% (21). However, the current study obtained a 7 percentage point increase in the

AUC after combining the GRS and clinical factors, a finding consistent with that reported in previous studies wherein an approximately 1 to 6 percentage point increase in AUCs for adult-onset T2D and gestational diabetes was noted after adding the GRS (27, 45, 54, 56–60). Larger studies have reported that a GRS promoted a considerable improvement in the discrimination of incident T2D, with Talmud et al. (61) showing an 8.1% net reclassification improvement with GRS and Läll y colleagues (62) reporting a 32.4% improvement. Although increasing the number of SNPs included in the GRS increase could improve its accuracy, this would come at increased cost and model complexity.

Specific information for pediatric populations has remained scarce, with previous reports failing to investigate the utility of incorporating the GRS into prediction models. Vassy et al. evaluated models for incident T2D using risk factors assessed in adolescence (demographics, family history, physical examination, and biomarkers) in conjunction with 38 SNPs. Although their findings showed a hazard ratio of 1.06–1.09 per risk allele, the addition of the GRS did not improve the discriminative ability of the model (63). Pitkänen et al., who examined whether the addition of a weighted GRS based on 73 genetic variants to childhood risk factors improved the identification of T2D risk during adulthood, reported a lower and non-significant net reclassification improvement for T2D (2.1%, $p = 0.158$) (64).

Genetic risk factors, which can be measured objectively, remain unchanged throughout the course of life. However, genotyping carries far greater costs compared to the measurement of conventional risk factors, which, in most cases, requires only a medical history and physical examination. Despite the improvement in pediatric-onset risk

classification after including a GRS, the modest effects compared to non-genetic risk factors (Z-BMI and maternal diabetes history) need to be considered, with insufficient evidence to recommend incorporating a GRS into clinical practice. In other words, despite the substantial relevance of a GRS for research studies, it provides limited clinical value to routine medical practice given its modest benefits in improving the prediction of T2D over traditional clinical risk factors. Other authors have reported similar results wherein genetic information provided no incremental value compared to standard non-invasive and metabolic markers, such as age, positive family history, and obesity (65).

A family history of diabetes and, in specific cases, a maternal history of diabetes reflects not only genetic predisposition but also shared environmental and lifestyle factors and even inclusive fetal programming (25, 66). In fact, Do and colleagues showed that a complete family history provides better prediction than 21 SNPs (67). Studies have indicated that a family history of T2D remains a strong, independent, and easily assessed risk factor for T2D (68).

Most SNPs included herein have also been associated with obesity. However, as reported by other authors, we observed that a genetic predisposition to obesity leads to increased risk for T2D independent of Z-BMI (69). Other authors that have evaluated the GRS in conjunction with non-genetic risk factors (obesity, unhealthy life style, family history of T2D among first-degree relatives, and socioeconomic status) have confirmed that latter lead to increased risk of T2D (52, 70–72). These observations highlight the need for prioritizing the prevention of environmental exposure over unmodifiable genetic factors. The main point that needs to be highlighted is that lifestyle interventions have been proven effective in preventing or delaying the T2D onset and could attenuate the effect of the genetic variants (21, 73–81). In addition, individuals who gain weight may be more susceptible to the cumulative impact of T2D variants (14).

The current study evaluated environmental risk factors in conjunction with a GRS, including SNPs previously reported to be associated with pediatric-onset T2D in Mexicans (23, 26, 27). However, the combined model (GRS and clinical factors) only explained 21% of the variance between cases and control. One of the limitations of this study is that

our results may not be generalizable to populations with different ethnic backgrounds. Other limitations include the cross-sectional design, which limited our ability to determine the effects

of the risk factors on the progression of T2D over time, the small number of individuals included due to the low prevalence of the disease among pediatric patients, the subjective measurements of dietary patterns.

Moreover, we cannot rule out other nonadditive models as an alternative to the unweighted GRS and whether the incorporation of a great number of variants among the hundreds of SNPs associated with T2D might enhance prediction. Furthermore, we could not confirm the association between dietary habits and the risk of pediatric-onset T2D. We believe that the case–control design prevented us from identifying dietary habits that increased risk given that nutritional management for the cases was established at the time of diagnosis. Nonetheless, follow-up studies could perhaps observe the effects of dietary habits on T2D risk as previously reported (82, 83). Despite the lack of association between dietary habits and T2D herein, the involvement of diet is obvious given that it is the main determinant for the Z-BMI. Taken together, larger studies employing a prospective design and including other SNPs and more objective measures of non-genetic factors are certainly needed.

In conclusion, the current study showed that a GRS based on

10 SNPs improved pediatric-onset T2D risk classification in Mexicans after accounting clinical risk factors. The above, is indicative of the clinical potential of adding genetic information in every day clinical practice. However, clinical risk factors, such as maternal history of diabetes and Z-BMI, which can be easily measured in clinical practice, remain the principal risk factors.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Ética en Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-L and MK-K participated in the conception and design of the study. AM-L, DJ-C, MC, and JV-G contributed to the acquisition of the data. AM-L, MK-K, and JV-G contributed to the analysis and interpretation of the data. AM-L, MK-K, and JV-G wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Federal Funds HIM 2014/041.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the association "Gral. y Lic. Aarón Sáenz Garza, A.C" for the scholarship provided to DJ-C, a student specializing in pediatrics, during the development of this project.

Bibliografía

1. Shamah-Levy T, V.-O.E., Heredia-Hernández O, Romero-Martínez' and M.-C.J. M, Cuevas-Nasu L, et al., *Encuesta Nacional de Salud y nutrición 2018-19: Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública* 2020.
2. Rojas-Martinez, R., et al., *[Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico.]* Salud Publica Mex, 2018. **60**(3): p. 224-232.
3. Hernandez-Avila, M., J.P. Gutierrez, and N. Reynoso-Noveron, *[Diabetes mellitus in Mexico. Status of the epidemic]*. Salud Publica Mex, 2013. **55 Suppl 2**: p. S129-36.
4. Jimenez-Corona, A., et al., *Early-onset type 2 diabetes in a Mexican survey: results from the National Health and Nutrition Survey 2006*. Salud Publica Mex, 2010. **52 Suppl 1**: p. S27-35.
5. Guerrero-Romero, F., R. Violante, and M. Rodriguez-Moran, *Distribution of fasting plasma glucose and prevalence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in the Mexican paediatric population*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2009. **23**(4): p. 363-9.
6. Chatterjee, S., K. Khunti, and M.J. Davies, *Type 2 diabetes*. Lancet, 2017. **389**(10085): p. 2239-2251.
7. Langenberg, C., et al., *Gene-lifestyle interaction and type 2 diabetes: the EPIC interact case-cohort study*. PLoS Med, 2014. **11**(5): p. e1001647.
8. Gamboa-Melendez, M.A., et al., *Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3314-21.
9. Dabelea, D., et al., *Association testing of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in multi-ethnic youth*. Diabetologia, 2011. **54**(3): p. 535-9.
10. Lerman-Garber I, A.-S.C., Tusié-Luna T, Velásquez D, Lobato Valverde M, Osornio-Flores M, et al., *Early-onset type 2 diabetes mellitus. The experience from a third level medical institution*. Gac. Mex, 2010. **146**: p. 179-84.
11. McQuaid, S., et al., *Early-onset insulin-resistant diabetes in obese Caucasians has features of typical type 2 diabetes, but 3 decades earlier*. Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1216-8.

12. Aguilar-Salinas, C.A., et al., *Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(1): p. 220-6.
13. Hatunic, M., et al., *Contrasting clinical and cardiovascular risk status between early and later onset type 2 diabetes*. Diab Vasc Dis Res, 2005. **2**(2): p. 73-5.
14. Cali, A.M., et al., *Primary defects in beta-cell function further exacerbated by worsening of insulin resistance mark the development of impaired glucose tolerance in obese adolescents*. Diabetes Care, 2009. **32**(3): p. 456-61.
15. Adeghate, E., P. Schattner, and E. Dunn, *An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1084**: p. 1-29.
16. Singh, R., J. Shaw, and P. Zimmet, *Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world*. Pediatr Diabetes, 2004. **5**(3): p. 154-68.
17. Shaw, J., *Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity*. Pediatr Diabetes, 2007. **8 Suppl 9**: p. 7-15.
18. Lammi, N., et al., *Childhood BMI trajectories and the risk of developing young adult-onset diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(3): p. 408-14.
19. Abraham, N.G., et al., *Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 256-75.
20. Whincup, P.H., et al., *Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review*. JAMA, 2008. **300**(24): p. 2886-97.
21. Lammi, N., et al., *The effect of birth order and parental age on the risk of type 1 and 2 diabetes among young adults*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2433-8.
22. Tusie Luna, M.T., *Genes and type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 210-22.
23. McCarthy, M.I. and E. Zeggini, *Genetics of type 2 diabetes*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(2): p. 147-54.
24. Carulli, L., et al., *Review article: diabetes, genetics and ethnicity*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22 Suppl 2**: p. 16-9.
25. Pratley, R.E., *Gene-environment interactions in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: lessons learned from the Pima Indians*. Proc Nutr Soc, 1998. **57**(2): p. 175-81.
26. International Diabetes Federation, w.i.o.i.-d.-f.h.w.i.o.i.-d.-f.

27. Vassy, J.L. and J.B. Meigs, *Is genetic testing useful to predict type 2 diabetes?* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(2): p. 189-201.
28. Stancakova, A. and M. Laakso, *Genetics of Type 2 Diabetes*. Endocr Dev, 2016. **31**: p. 203-20.
29. F, C. *Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)*.
30. Wang, X., et al., *Genetic markers of type 2 diabetes: Progress in genome-wide association studies and clinical application for risk prediction*. J Diabetes, 2016. **8**(1): p. 24-35.
31. Berumen, J., et al., *Influence of obesity, parental history of diabetes, and genes in type 2 diabetes: A case-control study*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2748.
32. Miranda-Lora, A.L., et al., *Genetic polymorphisms associated with pediatric-onset type 2 diabetes: A family-based transmission disequilibrium test and case-control study*. Pediatr Diabetes, 2019. **20**(3): p. 239-245.
33. Florez, J.C., et al., *TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 241-50.
34. Andersson, E.A., et al., *Genetic risk score of 46 type 2 diabetes risk variants associates with changes in plasma glucose and estimates of pancreatic β -cell function over 5 years of follow-up*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3610-7.
35. Saxena, R., et al., *Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(3): p. 410-25.
36. Layton, J., et al., *Type 2 Diabetes Genetic Risk Scores Are Associated With Increased Type 2 Diabetes Risk Among African Americans by Cardiometabolic Status*. Clin Med Insights Endocrinol Diabetes, 2018. **11**: p. 1179551417748942.
37. Stančáková, A., et al., *Genetic risk scores in the prediction of plasma glucose, impaired insulin secretion, insulin resistance and incident type 2 diabetes in the METSIM study*. Diabetologia, 2017. **60**(9): p. 1722-1730.
38. Rao, P., et al., *Validation of Type 2 Diabetes Risk Variants Identified by Genome-Wide Association Studies in Northern Han Chinese*. Int J Environ Res Public Health, 2016. **13**(9).
39. Pigeyre, M., et al., *ACE and Type 2 Diabetes Risk: A Mendelian Randomization Study*. Diabetes Care, 2020. **43**(4): p. 835-842.

40. Fontaine-Bisson, B., et al., *Evaluating the discriminative power of multi-trait genetic risk scores for type 2 diabetes in a northern Swedish population*. *Diabetologia*, 2010. **53**(10): p. 2155-62.
41. de Miguel-Yanes, J.M., et al., *Genetic risk reclassification for type 2 diabetes by age below or above 50 years using 40 type 2 diabetes risk single nucleotide polymorphisms*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(1): p. 121-5.
42. Rubio-Cabezas, O., et al., *ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents*. *Pediatr Diabetes*, 2014. **15 Suppl 20**: p. 47-64.
43. *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. *Diabetes Care*, 2020. **43**(Suppl 1): p. S14-s31.
44. Parra, E.J., et al., *Genome-wide association study of type 2 diabetes in a sample from Mexico City and a meta-analysis of a Mexican-American sample from Starr County, Texas*. *Diabetologia*, 2011. **54**(8): p. 2038-46.
45. Martinez-Marignac, V.L., et al., *Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors*. *Hum Genet*, 2007. **120**(6): p. 807-19.
46. Galanter, J.M., et al., *Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(3): p. e1002554.
47. Keskin, M., et al., *Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents*. *Pediatrics*, 2005. **115**(4): p. e500-3.
48. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
49. Hills, A.P., N. Mokhtar, and N.M. Byrne, *Assessment of physical activity and energy expenditure: an overview of objective measures*. *Front Nutr*, 2014. **1**: p. 5.
50. Treviño, R.P., et al., *Impact of the Bienestar school-based diabetes mellitus prevention program on fasting capillary glucose levels: a randomized controlled trial*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2004. **158**(9): p. 911-7.
51. Miranda-Lora, A.L., et al., *Exploring single nucleotide polymorphisms previously related to obesity and metabolic traits in pediatric-onset type 2 diabetes*. *Acta Diabetol*, 2017. **54**(7): p. 653-662.

52. Miranda-Lora, A.L., et al., *Associations of common variants in the SLC16A11, TCF7L2, and ABCA1 genes with pediatric-onset type 2 diabetes and related glycemic traits in families: A case-control and case-parent trio study.* *Pediatr Diabetes*, 2017. **18**(8): p. 824-831.
53. Buniello, A., et al., *The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019.* *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D1005-D1012.
54. Miranda-Lora, A.L., et al., *Heritability, parental transmission and environment correlation of pediatric-onset type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome-related traits.* *Diabetes Res Clin Pract*, 2017. **126**: p. 151-159.
55. Genomes Project, C., et al., *A global reference for human genetic variation.* *Nature*, 2015. **526**(7571): p. 68-74.
56. Giannini, C., et al., *Co-occurrence of risk alleles in or near genes modulating insulin secretion predisposes obese youth to prediabetes.* *Diabetes Care*, 2014. **37**(2): p. 475-82.
57. Dubinina, I.A., et al., *Studying progression from glucose intolerance to type 2 diabetes in obese children.* *Diabetes Metab Syndr*, 2014. **8**(3): p. 133-7.
58. Janipalli, C.S., et al., *Analysis of 32 common susceptibility genetic variants and their combined effect in predicting risk of Type 2 diabetes and related traits in Indians.* *Diabet Med*, 2012. **29**(1): p. 121-7.
59. Qi, Q., et al., *Combined effects of 17 common genetic variants on type 2 diabetes risk in a Han Chinese population.* *Diabetologia*, 2010. **53**(10): p. 2163-6.
60. Cornelis, M.C., et al., *Joint effects of common genetic variants on the risk for type 2 diabetes in U.S. men and women of European ancestry.* *Ann Intern Med*, 2009. **150**(8): p. 541-50.
61. Inaishi, J., et al., *Association Between Genetic Risk and Development of Type 2 Diabetes in a General Japanese Population: The Hisayama Study.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2019. **104**(8): p. 3213-3222.
62. *Prospective association of a genetic risk score and lifestyle intervention with cardiovascular morbidity and mortality among individuals with type 2 diabetes: the Look AHEAD randomised controlled trial.* *Diabetologia*, 2015. **58**(8): p. 1803-13.
63. Abdullah, N., et al., *Predicting type 2 diabetes using genetic and environmental risk factors in a multi-ethnic Malaysian cohort.* *Public Health*, 2017. **149**: p. 31-38.

64. Do, C.B., et al., *Comparison of family history and SNPs for predicting risk of complex disease*. PLoS Genet, 2012. **8**(10): p. e1002973.
65. Kawai, V.K., et al., *A genetic risk score that includes common type 2 diabetes risk variants is associated with gestational diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf), 2017. **87**(2): p. 149-155.
66. Kim, S.H., et al., *Predicting risk of type 2 diabetes mellitus in Korean adults aged 40-69 by integrating clinical and genetic factors*. Prim Care Diabetes, 2019. **13**(1): p. 3-10.
67. Kwak, S.H., et al., *Prediction of type 2 diabetes in women with a history of gestational diabetes using a genetic risk score*. Diabetologia, 2013. **56**(12): p. 2556-63.
68. Läll, K., et al., *Personalized risk prediction for type 2 diabetes: the potential of genetic risk scores*. Genet Med, 2017. **19**(3): p. 322-329.
69. Lyssenko, V., et al., *Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2220-32.
70. Monteiro, L.J., et al., *Fetal programming and gestational diabetes mellitus*. Placenta, 2016. **48 Suppl 1**: p. S54-s60.
71. Mühlenbruch, K., et al., *The value of genetic information for diabetes risk prediction - differences according to sex, age, family history and obesity*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64307.
72. Pitkänen, N., et al., *Role of Conventional Childhood Risk Factors Versus Genetic Risk in the Development of Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose in Adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Diabetes Care, 2016. **39**(8): p. 1393-9.
73. Talmud, P.J., et al., *Sixty-five common genetic variants and prediction of type 2 diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(5): p. 1830-40.
74. Tam, C.H., et al., *Use of net reclassification improvement (NRI) method confirms the utility of combined genetic risk score to predict type 2 diabetes*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83093.
75. Vassy, J.L., et al., *Association between parental history of diabetes and type 2 diabetes genetic risk scores in the PPP-Botnia and Framingham Offspring Studies*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93**(2): p. e76-e79.
76. Scott, R.A., et al., *The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPIC-InterAct study*. Diabetologia, 2013. **56**(1): p. 60-9.

77. Zhu, J., et al., *Association of genetic predisposition to obesity with type 2 diabetes risk in Han Chinese individuals*. *Diabetologia*, 2014. **57**(9): p. 1830-3.
78. Werissa, N.A., et al., *SNP-Based Genetic Risk Score Modeling Suggests No Increased Genetic Susceptibility of the Roma Population to Type 2 Diabetes Mellitus*. *Genes (Basel)*, 2019. **10**(11).
79. van Zon, S.K.R., et al., *The Interaction of Genetic Predisposition and Socioeconomic Position With Type 2 Diabetes Mellitus: Cross-Sectional and Longitudinal Analyses From the Lifelines Cohort and Biobank Study*. *Psychosom Med*, 2018. **80**(3): p. 252-262.
80. Kim, D.S., et al., *High genetic risk scores for impaired insulin secretory capacity doubles the risk for type 2 diabetes in Asians and is exacerbated by Western-type diets*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2018. **34**(1).
81. Echouffo-Tcheugui, J.B., S.D. Dieffenbach, and A.P. Kengne, *Added value of novel circulating and genetic biomarkers in type 2 diabetes prediction: a systematic review*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013. **101**(3): p. 255-69.
82. Chikowore, T., et al., *Predictive utility of a genetic risk score of common variants associated with type 2 diabetes in a black South African population*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016. **122**: p. 1-8.
83. Ding, M., et al., *Additive and Multiplicative Interactions Between Genetic Risk Score and Family History and Lifestyle in Relation to Risk of Type 2 Diabetes*. *Am J Epidemiol*, 2020. **189**(5): p. 445-460.
84. Gillies, C.L., et al., *Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis*. *Bmj*, 2007. **334**(7588): p. 299.
85. Hivert, M.F., et al., *Updated genetic score based on 34 confirmed type 2 diabetes Loci is associated with diabetes incidence and regression to normoglycemia in the diabetes prevention program*. *Diabetes*, 2011. **60**(4): p. 1340-8.
86. Juonala, M., et al., *Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(20): p. 1876-85.
87. Li, H., et al., *Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and type 2 diabetes risk among 550,000 Chinese adults: results from 2 independent Asian cohorts*. *Am J Clin Nutr*, 2020. **111**(3): p. 698-707.
88. Paulweber, B., et al., *A European evidence-based guideline for the prevention of type 2 diabetes*. *Horm Metab Res*, 2010. **42 Suppl 1**: p. S3-36.

89. Schnurr, T.M., et al., *Obesity, unfavourable lifestyle and genetic risk of type 2 diabetes: a case-cohort study*. *Diabetologia*, 2020. **63**(7): p. 1324-1332.
90. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
91. Ericson, U., et al., *Dietary and genetic risk scores and incidence of type 2 diabetes*. *Genes Nutr*, 2018. **13**: p. 13.
92. Li, S.X., et al., *Interplay between genetic predisposition, macronutrient intake and type 2 diabetes incidence: analysis within EPIC-InterAct across eight European countries*. *Diabetologia*, 2018. **61**(6): p. 1325-1332.
93. Andersson, E.A., et al., *Genetic risk score of 46 type 2 diabetes risk variants associates with changes in plasma glucose and estimates of pancreatic beta-cell function over 5 years of follow-up*. *Diabetes*, 2013. **62**(10): p. 3610-7.