



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD**

**TÍTULO**

**Identificación de variantes genéticas asociadas a la resistencia a la insulina  
a través de la secuenciación del exoma completo en niños Mayas**

**TESIS QUE PARA OPTAR PARA EL GRADO DE: DOCTOR EN  
CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. BARBARA ITZEL PEÑA ESPINOZA**

**TUTOR:**

**Dra. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA. Facultad de Química. UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**Dra. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA. Facultad de Química UNAM.**

**Dra. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA. Instituto Nacional de Medicina  
Genómica.**

**Dra. ADRIANA MONROY GUZMÁN. Hospital General de México**

**Dr. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ. Instituto Nacional de Cardiología**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL DEL 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado bajo el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (Proyectos IN221014 e IN231511), Hospital Juárez de México y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario 261067).

## **Agradecimientos**

Este trabajo supone para mí el final de una etapa maravillosa y el comienzo de una nueva, por el momento desconocida y llena de interrogantes. Dicen que más vale lo malo conocido que lo bueno por conocer, pero durante estos años lejos de mi familia he conocido pocas cosas malas. Ello debo agradecerse, en primer lugar, a la Dra. Marta Menjivar por aceptarme y hacerme parte de su grupo de trabajo, gracias por su apoyo, confianza, por guiarme y orientarme no solo en mi formación como investigador, sino también en mi formación humana, a la Dra. Ángeles Granados y a la Dra. Guadalupe Ortiz gracias por brindarme todo su apoyo, tolerancia, por el impulso y el cariño, gracias por hacerme sentir como si estuviera en casa. Gracias todos los integrantes de mi familia creo poder presumir de haberme empapado de su manera de entender la vida sin ustedes esto no hubiera sido posible, gracias a todos mis compañeros de laboratorio y a mis amigos que me tuvieron paciencia, me dieron ánimo, me acompañaron en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Este trabajo representa la culminación de una de mis tantas metas, dedicada a mi Madre, que es mi fuente de inspiración, coraje, es la batería que me brinda la fuerza para salir cada día a luchar por cumplir mis sueños, a mi padre, que a pesar de la distancia siempre estuvo atento para saber cómo iba mi proceso. Y por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis hermanos que son las personas que más me han ayudado a superar las penas y a compartir las glorias (de estas, pocas) en todo este tiempo y que han hecho que estos años sean una etapa inolvidable, gracias por acompañarme en esta aventura de forma incondicional. LO LOGRAMOS

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>3</b>
<b>Índice de esquemas .....</b>	<b>6</b>
<b>Índice de gráficas .....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>8</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>15</b>
I.1 Resistencia a la insulina .....	15
I.1.1 Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina .....	17
I.2 Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina.....	18
I.2.1 Clamp hiperinsulinémico y clamp hiperglucémico .....	18
I.2.2 Índices de sensibilidad a la insulina basados en el ayuno.....	19
I.3 Prevalencia de la resistencia a la insulina en población infantil .....	20
I.4 Resistencia a la insulina y obesidad.....	20
I.5 Resistencia a la insulina y síndrome metabólico .....	22
I.6 Genética de la resistencia a la insulina .....	24
I.7 Genética de la población mexicana.....	27
I.8 Importancia del estudio de RI en población Maya a través de herramientas genómicas de nueva generación.....	28
<b>II. Justificación.....</b>	<b>30</b>
<b>III. Hipótesis .....</b>	<b>31</b>
<b>IV. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
IV.1 Objetivo general .....	32
IV.2 Objetivos particulares.....	32
<b>V. Material y métodos.....</b>	<b>33</b>
V.1 Tipo de estudio.....	33
V.2 Diseño de estudio: .....	33
V.3 Tamaño de la muestra .....	35
V.4 Definición de fenotipo extremo.....	35
V.5 Criterios de inclusión.....	35
V.5 Criterios de exclusión.....	36
V.6 Datos generales, medidas somatométricas y muestras sanguíneas.....	36
V.7 Determinaciones bioquímicas .....	37
V.8 Análisis molecular .....	37
V.9 Generación de librerías y secuenciación .....	37
V.10 Análisis de exoma .....	39
V.11 Análisis estadístico.....	43
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>44</b>
Primera etapa.....	44
Descripción de la población .....	44

Estratificación de la población de acuerdo al IMC .....	44
Descripción de los parámetros bioquímicos y somatométricos de la población general .....	45
Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por sexo.....	46
Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por escuela....	47
Frecuencias alélicas de los polimorfismos evaluados .....	48
Búsqueda de la asociación y correlación de los polimorfismos de la primera etapa con los parámetros bioquímicos y somatométricos.....	49
Segunda etapa .....	52
Frecuencia de RI.....	52
Selección de fenotipos extremos de RI .....	53
Estrategia para la identificación de variantes genéticas involucradas en la RI ..	54
<b>VII. Discusión .....</b>	<b>58</b>
<b>III. Conclusión .....</b>	<b>68</b>
<b>IX. Anexos .....</b>	<b>69</b>
IX.1 Datos generales y somatométricos .....	69
IX.2 Determinaciones bioquímicas .....	69
IX.2.1 Glucosa .....	69
IX.2.2 Colesterol .....	70
IX.2.3 Triglicéridos .....	71
IX.2.4 c-HDL .....	71
IX.2.5 c-LDL .....	72
IX.2.6 Insulinas .....	72
IX.3 Determinaciones moleculares .....	73
IX.3.1 Extracción de DNA .....	73
IX.3.1.1 Integridad del DNA .....	74
IX.3.2 PCR .....	74
IX.3.2 Preparación Sacarosa-Tritón 2X.....	77
IX.3.3 Preparación de Proteínasa K (5mg/mL).....	77
IX.3.4 Preparación de Buffer de lisis-nuclear .....	77
IX.3.5 Preparación de Cloruro de Sodio saturado.....	77
IX.3.6 Gel de Agarosa al 1.5% .....	78
IX.3.8 Buffer TBE 10X .....	78
IX.3.9 Buffer de carga para DNA.....	78
IX.4 Selección de casos y controles.....	78
<b>X. Referencias .....</b>	<b>80</b>

## Índice de esquemas

<b>Esquema 1.</b> Diseño experimental primera etapa.....	<b>33</b>
<b>Esquema 2.</b> Diseño experimental segunda etapa.....	<b>34</b>
<b>Esquema 3.</b> Selección de casos-contróles para la búsqueda de genes asociados a resistencia a la insulina .....	<b>53</b>
<b>Esquema 4.</b> Estrategia de selección de variantes genéticas asociadas a RI en los niños Mayas .....	<b>54</b>
<b>Esquema 5.</b> Genes en los que se encontraron variantes asociadas a RI y diabetes .....	<b>57</b>
<b>Esquema 6.</b> Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	<b>75</b>
<b>Esquema 7.</b> Mecanismo de la PCR con sondas Taqman .....	<b>76</b>

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1:</b> Distribución por sexo .....	<b>44</b>
<b>Gráfica 2:</b> Distribución de acuerdo al percentil de IMC .....	<b>44</b>
<b>Gráfica 3:</b> Frecuencia de resistencia a la insulina .....	<b>52</b>



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Descripción de los polimorfismos seleccionados.....	<b>27</b>
<b>Tabla 2.</b> Descripción de los parámetros bioquímicos y somatométricos de la población general .....	<b>45</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por sexo .....	<b>46</b>
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por escuela .....	<b>47</b>
<b>Tabla 5.</b> Frecuencias alélicas y comparación con el 1000 genomas.....	<b>48</b>
<b>Tabla 6.</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs10811661 de <i>CDKN2A/2B</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 7.</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs7903146 de <i>TCF7L2</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 8:</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs9282541 de <i>ABCA1</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabla 9:</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs2237875 de <i>KCNQ1</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabla 10:</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs780094 de <i>GCKR</i> .....	<b>51</b>
<b>Tabla 11:</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs2237895 de <i>KLF14</i> .....	<b>51</b>
<b>Tabla 12:</b> Asociaciones genotipo-fenotipo de rs4675095 de <i>IRS</i> .....	<b>52</b>
<b>Tabla 13.</b> Descripción de la función de las variantes genéticas encontradas.....	<b>55</b>

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ALT</b>	Alanina transaminasa
<b>BAM</b>	Alineación binaria/formato MAP
<b>BWA</b>	Herramienta de alineación Burrows-wheeler
<b>CDI</b>	Comisión nacional para el desarrollo de los pueblos indígenas
<b>c-HDL</b>	Colesterol de HDL
<b>c-LDL</b>	Colesterol de LDL
<b>c-VLDL</b>	Colesterol de VLDL
<b>dbNSFP</b>	Base de datos para predicciones funcionales de polimorfismos no sinónimo
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminoacético
<b>ENSANUT</b>	Encuesta nacional de salud y nutrición
<b>FATHMM</b>	Análisis funcional a través de modelos ocultos de Markov
<b>GATK</b>	Kit de herramientas de análisis del genoma
<b>GWAS</b>	Estudios de asociación de genoma completo
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HOMA-B</b>	Modelo homeostático de la evaluación de la función de la célula Beta
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático de la evaluación de la resistencia a la insulina
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>H-W</b>	Hardy Weinberg
<b>ICC</b>	Índice cintura cadera
<b>IDF</b>	Federación internacional de diabetes
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS-1</b>	Receptor de la insulina sustrato 1
<b>KDa</b>	Kilo daltons
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad

<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo menor
<b>MAP</b>	Cinasas activadas por mitógeno
<b>mg</b>	Miligramos
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OR</b>	Razón de probabilidades
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pCintura</b>	Percentil de cintura
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pIMC</b>	Percentil de IMC
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 cinasa
<b>PolyPhen2</b>	Polimorfismo-fenotipo versión 2
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAM</b>	Secuencia de alineamiento/formato MAP
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SIFT</b>	Programa de clasificación tolerante del intolerante
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>SNV</b>	Variantes de único nucleótido
<b>Ser473</b>	Serina 474
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TZD</b>	Tiazolidinedionas
<b>V</b>	Volts
<b>VCF</b>	Formato de llamada de variante
<b>Wnt</b>	Gen del segmento polar de Drosophila Melanogaster sin alas

## Resumen

**Antecedentes:** La resistencia a la insulina (RI) es una condición que comúnmente precede al síndrome metabólico (SM) y de allí al desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2). Según la ENSANUT 2012 la frecuencia de DT2 es de 14% en Yucatán. La RI depende de factores genéticos y ambientales. Existen evidencias de que la obesidad, la inflamación y/o el estrés oxidativo tienen un papel en la patogénesis de la RI. Datos previos de nuestro grupo muestran frecuencias elevadas de RI en escolares de Yucatán. La RI a edades tempranas sugiere fuertemente la presencia de un componente genético relevante. El objetivo del proyecto fue evaluar variantes previamente reportadas y buscar variantes genéticas propias de la población Maya asociadas a RI a través de la secuenciación del exoma completo.

**Diseño experimental:** el estudio se dividió en dos fases: en la fase uno se buscó la asociación de los polimorfismos rs4675095 (*IRS1*), rs780094 (*GCKR*), rs972283 (*KLF14*), rs10965250 (*CDKN2A/2B*), rs2237895 (*KCNQ1*), rs7903146 (*TCF7L2*) y rs9282541 (*ABCA1*) con RI en los niños mayas. La fase dos consistió en un estudio caso-control (10 casos y 10 controles) con fenotipo extremo de RI, esta fase se realizó mediante la secuenciación del exoma completo y el análisis bioinformático de las muestras seleccionadas de acuerdo con los criterios de inclusión, para después validar las posibles nuevas variantes en 500 niños participantes. **Resultados:** el 39.4% de los niños presentaron RI, 38.3% presentaron sobrepeso/obesidad. Todos los SNPs analizados cumplieron con el equilibrio de H-W. El estudio reveló la asociación de los polimorfismos seleccionados con glucosa alterada en ayuno (rs10965250, rs9282541, rs7903146) hipoalfalipoproteinemia (rs9282541), hipertrigliceridemia (rs7903146), hipercolesterolemia (rs7903146) y RI (rs972283, rs780094, rs2237895, rs4675095). Con respecto al estudio caso-control de fenotipo extremo, la identificación de variantes genéticas con un efecto funcional sobre el desarrollo de RI y DT2 se llevó a cabo a través de programas de modelaje *insilico*, se consideró variante de riesgo a aquellas que tuvieron un puntaje positivo en al menos tres de los cuatro programas de predicción empleados, de esta manera se encontraron 16 variantes asociadas con el desarrollo de RI y DT2 en los niños Mayas de la

península de Yucatán. Este es el primer trabajo que emplea al exoma para el estudio de RI en los niños Mayas. Los resultados encontrados evidencian la presencia de variantes genéticas comunes y propias implicadas en el desarrollo de RI en la población indígena mexicana a edades tempranas, enfatizando las ventajas del uso de herramientas genómicas y estrategias novedosas de análisis de datos en el estudio de condiciones como la RI que en conjunto sientan las bases para el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y blancos terapéuticos a corto y largo plazo.

## Abstract

**Background:** Insulin resistance (IR) is a condition that commonly precedes the metabolic syndrome (MS) and hence the development of type 2 diabetes (T2D). According to ENSANUT 2012, the frequency of DT2 is of 14% in Yucatán. The RI depends on genetic and environmental factors. There is evidence that obesity, inflammation and / or oxidative stress have a role in the pathogenesis of IR. Previous data from our group show high RI frequencies in children from Yucatán. The IR at an early age strongly suggests the presence of a relevant genetic component. The objective of the project was to evaluate previously reported variants and search for new genetic variants of the Maya population associated with RI through the sequencing of the complete exome. **Experimental design:** the study was divided into two phases: in phase one the association of the polymorphisms rs4675095 (IRS1), rs780094 (GCKR), rs972283 (KLF14), rs10965250 (CDKN2A / 2B), rs2237895 (KCNQ1), rs7903146 was searched (TCF7L2) and rs9282541 (ABCA1) with the RI in Maya children. Phase two consisted of a case-control study (10 cases and 10 controls) with extreme phenotype of RI, this phase was performed by sequencing the complete exome and the bioinformatic analysis of the selected samples according to the inclusion criteria, for then validate the possible new variants in 500 participating children. **Results:** 39.4% of the children presented IR, 38.3% presented overweight / obesity. All SNPs analyzed is in Hardy-Weinberg equilibrium. The study revealed the association of the selected polymorphisms with impaired fasting glucose (rs10965250, rs9282541, rs7903146) hypoalphalipoproteinemia (rs9282541), hypertriglyceridemia (rs7903146), hypercholesterolemia (rs7903146) and RI (rs972283, rs780094, rs2237895, rs4675095). With respect to the case-control study of extreme phenotype, the identification of genetic variants with a functional effect on the development of IR and DT2 was carried out through in silico modeling programs, a risk variant was considered to those that had a score positive in at least three of the four prediction programs used, in this way 16 variants were found associated with the development of RI and DT2 in the Maya children of the Yucatan peninsula. This is the first work that uses exome for the study of RI in

Maya children. The results show the presence of common and own genetic variants involved in the development of IR in the Mexican indigenous population at an early age, emphasizing the advantages of the use of genomic tools and novel strategies of data analysis in the study of conditions such as RI that together they lay the foundations for the development of new diagnostic tools and therapeutic targets in the short and long term.

## **I. Introducción**

La resistencia a la insulina (RI) se caracteriza por una respuesta biológica atenuada a la acción de la insulina ante niveles normales o elevados de la misma. Se encuentra asociada al riesgo de presentar diabetes tipo 2 (DT2) y síndrome metabólico (SM) además de estar relacionada a circunstancias como sobrepeso y/o obesidad (1). La RI tiene una etiología compleja caracterizada por un componente genético poligénico que está condicionado por la interacción con los componentes ambientales y el estilo de vida (2). El diagnóstico de RI se lleva a cabo a través del cálculo del índice de resistencia HOMA-IR utilizando las concentraciones de glucosa e insulina basales (3, 4). La RI es un factor etiológicamente determinante en la presencia de SM, lo cual resalta la importancia de que deba ser diagnosticada tempranamente en la población pediátrica con la finalidad de retrasar la aparición de alteraciones metabólicas relacionadas con este síndrome (4, 5), por lo que es necesario determinar la prevalencia de RI en la población infantil, además de identificar las variantes genéticas implicadas en el desarrollo de esta patología. Los estudios genéticos y epidemiológicos son muy importantes para el esclarecimiento del papel que tienen los polimorfismos en los mecanismos que regulan la secreción de la insulina, un ejemplo de ellos son los GWAS (estudios de asociación del genoma completo) que han tenido éxito en la identificación de *loci* implicados en la secreción de la insulina y los cuales a su vez se han asociado a DT2 (6). Por otra parte, el estudio funcional *insilico* de las nuevas variantes genéticas identificadas a través de las estrategias de secuenciación de nueva generación apoyan a establecer la correlación fisiológica y bioquímica de los polimorfismos con las de vías de señalización molecular, lo que permitirá conocer los factores de predisposición genética. Los resultados ayudarán a generar nuevas y mejores estrategias de tratamiento, además que la detección precoz puede evitar el desarrollo de esta condición fisiopatológica.

### **I.1 Resistencia a la insulina**

La RI se caracteriza por una capacidad disminuida de la insulina para llevar sus funciones fisiológicas normales. La insulina es una hormona anabólica producida



en el páncreas y está implicada en una variedad de procesos fisiológicos (7). Desde la secuenciación del gen que codifica para el receptor de la insulina en 1985, se desencadenaron una serie de trabajos que han desembocado en el descubrimiento de una elaborada red de señalización de la insulina con diversas alteraciones del metabolismo, crecimiento celular y células diana (7-9). Los efectos de la insulina, la deficiencia de insulina y la RI varían de acuerdo con la función fisiológica de los tejidos y el requerimiento de insulina para realizar los procesos metabólicos (10). La acción de la insulina y su secreción están fisiológicamente interconectadas, por lo que un defecto inicial en cualquiera de los dos procesos conduce a un déficit en el metabolismo de la glucosa (11). La RI se desencadena cambios a nivel metabólico entre ellos: 1) la disminución en la captura de glucosa, 2) disminución en la síntesis hepática de glucógeno y 3) aumento en la producción hepática de glucosa (12). Se conoce que según progresa la RI y la hiperinsulinemia compensadora, los islotes se tornan incapaces de sostener el estado de hiperinsulinemia lo que conduce a la intolerancia a la glucosa con elevación de la glucosa postprandial y posterior declinación en la secreción de la insulina con aumento en la producción hepática de glucosa y diabetes; paralelamente, la RI conduce a disminución en la utilización de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina (hiperglucemia postprandial) y al aumento en la producción hepática de glucosa (hiperglucemia en ayuno) (13). En los niños la RI se ha estudiado poco, la mayoría de los casos de RI son relacionados con la presencia de obesidad (14). La RI crónica o mantenida es el rasgo común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DT2, la obesidad, la HTA, las dislipemias o la enfermedad cardiovascular (15).

### **I.1.1 Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina**

La mayoría de las acciones biológicas de la insulina se llevan a cabo mediante la activación de dos vías principales de señalización, la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt) que tiene un papel central en la regulación de la adipogénesis, transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y proteínas, además de la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPK/Ras) que regula la expresión genética y los efectos mitogénicos asociados a la insulina (16). La RI es un estado donde las células blanco no pueden responder a los niveles normales de insulina circulante. Los estudios para conocer la etiología y los mecanismos moleculares de la RI se centran en las alteraciones de los componentes de la cascada de señalización de la insulina (17). La señalización alterada de la insulina es resultado de mutaciones y/o modificaciones posteriores a la traducción del receptor de la insulina o de las moléculas efectoras río abajo del mismo. Los estudios moleculares de la RI se centran en la función reguladora negativa de la insulina, la cual se atribuye a los agentes que potencian la fosforilación de serina/treonina de las proteínas de los receptores IRS-1 e IRS-2, estos estudios han demostrado que el aumento en la fosforilación de cinasas de serina/treonina interfiere en la unión de IRS-1 o IRS-2 con el dominio yuxtamembrana evitando la fosforilación posterior de tirosina, donde la hiperfosforilación de residuos serina/treonina de la proteína IRS ocasiona una disminución de la fosforilación de tirosina que conduce a una reducción en la interacción con PI3K alterando la fosforilación y activación de la cinasa de Akt que conduce a un estado de hiperinsulinemia compensadora sostenida que conlleva al agotamiento de la célula  $\beta$  y al desarrollo de RI y DT2 (18-21). Algunos autores coinciden que este es el mecanismo molecular donde convergen la lipotoxicidad, inflamación, hiperglucemia y el estrés oxidativo con la resistencia a la insulina (22, 23). Recientemente se identificó que *PHLPP-1* y *Grb14* contribuyen a la RI por una regulación negativa de la actividad de Akt a través de la desfosforilación de Akt a Ser473 (19). Aunado a los estudios moleculares, los estudios genéticos también se han enfocado en el estudio de mutaciones puntuales en receptores y moléculas de señalización de la insulina, los resultados revelan genes implicados en el

aumento de la renovación de proteínas, reducción de la expresión y afinidad del ligando, disminución en la capacidad de señalización, entre los que destacan los polimorfismos en el gen *TBC1D4* que juegan un papel importante en la regulación de la acción de la insulina (24), el polimorfismo G972R de *IRS-1* involucrado en la acción y secreción de la insulina (25), los polimorfismos en *IGF-I* que afectan las vías de señalización de la insulina (26), las mutaciones en *AKT* asociadas a RI y diabetes (27), además de las variantes de los genes *PTEN* y *TRIB3* asociados a RI y diabetes de inicio temprano (28-30). Hasta el momento se han identificado 38 *locis* de susceptibilidad a DT2 a través de sus efectos sobre la RI, sin embargo, estos hallazgos solo explican de un 10-15% de la heredabilidad genética de la RI, es necesario realizar nuevas estrategias de búsqueda de variantes genéticas involucradas en esta condición.

## **I.2 Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina**

Existen diferentes métodos para la determinación de RI, todos ellos basados en aproximaciones matemáticas indirectas de la relación glucosa-insulina en el estado de ayuno o después de haber recibido un estímulo por vía oral o intravenosa (3, 31, 32). En el siguiente apartado se describen las principales alternativas diagnósticas de RI.

### **I.2.1 Clamp hiperinsulinémico y clamp hiperglucémico**

El estándar de oro para el diagnóstico de la resistencia a la insulina es la técnica del *clamp*, propuesta por DeFronzo y colaboradores en 1979 (31). Es el único método que evalúa la sensibilidad a la insulina *in vivo* además de que permite conocer la respuesta de la célula  $\beta$  al estímulo de glucosa (33-35). Dos variantes de esta técnica han sido descritas: el *clamp* hiperinsulinémico, que es un método de referencia el cual permite medir la sensibilidad a la acción de la insulina *in vivo* y se basa en cuantificar la utilización global de la glucosa bajo un estímulo de insulina, este es el método más exacto. Por otro, lado el *clamp* hiperglucémico mide la respuesta pancreática a la glucosa bajo condiciones de hiperglucemia, esta técnica permite evaluar la secreción bifásica de la insulina *in vivo*, por lo que alteraciones en la primera fase de secreción serán reflejo de daño en la célula  $\beta$

(15, 36). A pesar de las ventajas que representan el empleo de estos métodos de cuantificación en cuanto a precisión y sensibilidad no son empleadas de manera cotidiana por ser técnicas laboriosas e invasivas, sin embargo, existen diversas aproximaciones matemáticas validadas con respecto al *clamp* que nos brindan una medición confiable de la RI.

### **I.2.2 Índices de sensibilidad a la insulina basados en el ayuno**

El índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) propuesto por Mathews y colaboradores, en 1985 (37), es el método más utilizado para diagnosticar RI en la población pediátrica. Es un modelo matemático que permite hacer inferencias sobre el grado de RI basado en las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno, el modelo se calibra con una función celular  $\beta$  de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 de acuerdo con la siguiente fórmula (37).

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[\text{insulina plasmática en ayuno } (\mu\text{U/ ml}) * \text{glucosa plasmática en ayuno (mmol/L)}]}{22.5.20}$$

El índice HOMA también puede utilizarse para evaluar la función de la célula  $\beta$  pancreática utilizando el siguiente modelo matemático:

$$\text{HOMA-}\beta = \frac{[20 * \text{insulina plasmática en ayuno } (\mu\text{U/ ml})]}{[\text{glucosa plasmática en ayuno (mmol/L)} - 3.5]}$$

Este método es uno de los más empleados en la determinación de RI por su correlación con el *clamp* aunado a la sencillez de la determinación.

La relación entre las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno simplemente reflejan el balance entre la utilización de glucosa hepática y la secreción de insulina que se mantiene por retroalimentación entre la célula  $\beta$  y el hígado (38). El HOMA es un método confiable y estandarizado con base al *clamp* que correlaciona con el estándar de oro para el diagnóstico de RI, a pesar de que existen diferentes aproximaciones matemáticas para la determinación de RI, el HOMA ha tenido mayor trascendencia en la práctica clínica (39). Existen diferentes puntos de corte para el diagnóstico de RI a través del HOMA-IR, en los adultos el punto de corte más aceptado es el de 2.5, sin embargo, este valor no

puede ser utilizado en población pediátrica (40). El punto de corte para el diagnóstico de RI con el HOMA-IR en la población pediátrica va desde un 2.86 hasta un 3.80 (35, 41), estos puntos de corte son mayores a los empleados en adultos por considerar la baja sensibilidad a la insulina atribuida a la transición puberal, además la RI y la hiperinsulinemia cambian continuamente a lo largo del periodo puberal con diferencias importantes por géneros y razas (42), no obstante el punto de corte más aceptado para el diagnóstico de RI en la población infantil es el 3.5 establecido por Cuartero y cols., por considerar los diversos estadios puberales en la estandarización del punto de corte de HOMA-IR (43).

### **I.3 Prevalencia de la resistencia a la insulina en población infantil**

Existe poca evidencia de la frecuencia de RI en población infantil, la mayoría de los estudios de RI son realizados en población con sobrepeso y/o obesidad, en los que se ha asociado la presencia de obesidad como un factor condicionante de RI y como un factor de riesgo para el desarrollo de SM y DT2. Los estudios de prevalencia de RI en niños obesos determinada por el índice de resistencia HOMA-IR son elevados; en niños obesos bolivianos los resultados fueron del 39.4% (44) mientras que en niños obesos en edad escolar de la ciudad de México del 90% y 87% en niños con sobrepeso. Algunos autores señalan que la RI aumenta con la severidad de la obesidad (45-47).

### **I.4 Resistencia a la insulina y obesidad**

La obesidad es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, el sobrepeso y la obesidad incrementan el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas, se estima que el 90% de los casos de DT2 se atribuyen al sobrepeso y la obesidad (48). En la población infantil la presencia de sobrepeso y/o obesidad está asociada con un riesgo incrementado de desarrollar RI, SM y DT2, es alarmante que estas complicaciones ya se encuentran en niños y adolescentes obesos, considerando que éstas pueden verse exacerbadas por la disminución fisiológica de la sensibilidad a la insulina asociada con el desarrollo puberal normal (49). A nivel poblacional la RI está fuertemente asociada con la obesidad, los niños con obesidad presentan hiperinsulinemia y RI con un

metabolismo de glucosa estimulado por la insulina en un 40% más bajo que los niños no obesos, además de que la RI está presente en más del 50% de los niños obesos (49, 50), con base en lo anterior se estima que solo el 55% de la varianza en la sensibilidad a la insulina en niños se puede explicar por la adiposidad. El aumento de tejido adiposo visceral abdominal se asocia con una menor sensibilidad a la insulina y una respuesta aguda a la insulina aunado a que la deposición ectópica de la grasa en el hígado también es responsable de la RI en niños obesos, sin dejar de lado que la obesidad tiene un fuerte componente genético, que interactúa con la exposición ambiental (51). En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil se ha triplicado, la prevalencia combinada es del 33.2%, indicando que tres de cada diez niños padece sobrepeso u obesidad, debido a estas frecuencias México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil (52).

El impacto genético en la variación del índice de masa corporal (IMC) es de un 40 y 70% con diferencias entre individuos y grupos étnicos (53). Esta situación es incluso más importante en la obesidad visceral, una condición clave en la patogénesis de la RI, en el que el 60% de la variación de los depósitos de grasa abdominal se debe probablemente a factores genéticos (54). Dicha sospecha está sostenida por los hallazgos de Groop en familiares de pacientes con DT2 (55). Todo este componente genético está fuertemente modulado por factores ambientales relacionados con los hábitos/estilos de vida como el exceso en la ingesta calórica, baja actividad física, exceso de grasas saturadas, dieta con bajo contenido en fibra, excesivo consumo de alcohol y tabaquismo (55, 56). Se ha demostrado recientemente, que el efecto de la interacción entre factores genéticos y ambientales es mayor que cuando se presentan de forma aislada con base en los estudios de interacción gen-gen y genes-ambiente (57). Aunque no se dispone de evidencias científicas suficientes para definir nítidamente las características de la compleja interacción genes-ambiente (58). Mayer y cols., han mostrado que los niveles circulantes de insulina están directamente asociados a la ingesta de grasa dietética e inversamente al grado de actividad física, y al consumo (moderado) de alcohol (59, 60). Por otra parte, existen datos sólidos que muestran el efecto

benéfico del ejercicio físico en la prevención de la DT2 desde el estadio de intolerancia a la glucosa (61, 62). Parece ser que tras la obesidad existe un genotipo ahorrador que surge a partir de la evolución del Homo sapiens. La hipótesis del genotipo ahorrador incluye que el crecimiento fetal se ve alterado cuantitativamente y cualitativamente de acuerdo a las características del entorno nutricional, el ahorro de energía para suplir las necesidades del crecimiento en forma relativa priorizando algunos vitales como el sistema nervioso central, el genotipo ahorrador es perjudicial cuando se expone a la abundancia de alimentos y origina RI y DT2 (63). Esta teoría de genotipo ahorrador emerge en diferentes grupos étnicos cuando se comparan sus estilos de vida, ejemplo de ello son los cazadores-recolectores de Australia y Latinoamérica y los agrícolas como los indios Pima e isleños del Pacífico, los cuales debido a la pérdida de costumbres ancestrales, se han visto afectados por la prevalencia de sobrepeso, obesidad, RI y DT2 (64-66). Por el contrario, en los indios Pima genéticamente idénticos, que viven en México y que han mantenido sus estilos de vida tradicionales del medio rural (alta actividad física, baja ingesta calórica con bajo contenido en grasas, dieta rica en fibra), la obesidad y otras alteraciones del SM son poco frecuente (67, 68). Es importante resaltar que, en el último siglo, la población mexicana aumentó la densidad energética de la dieta en casi 24 % (26 % más hidratos de carbono y 36 % más grasas) y han reducido la actividad física (69). La consecuencia de este cambio en el balance de energía es la acumulación de grasa corporal, a la que llamamos obesidad y que hasta el momento es considerado como el factor más importante para la aparición de RI y SM, en los niños con sobrepeso la frecuencia de SM es elevada del 30% al 50% donde la obesidad visceral y la sensibilidad reducida a la insulina son los principales mecanismos implicados en este síndrome (70).

### **I.5 Resistencia a la insulina y síndrome metabólico**

El SM es una entidad clínica controvertida que se caracteriza por la presencia de múltiples factores de riesgo como lo son obesidad central, glucosa alterada en ayuno, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y PA elevada, la presencia de al menos tres de estos cinco criterios se define como SM, la etiología del SM es

desconocida, sin embargo, se considera que está determinada por una compleja interacción de factores genéticos y condicionada por factores ambientales (38, 71). El eje central en el desarrollo del SM es la RI, desde 1988 Reaven sugiere que la RI conduce a las anomalías metabólicas que conforman el SM (72), esta conjunción de factores de riesgo interrelacionados se asocian con un riesgo cinco veces mayor a desarrollar DT2 y dos veces más de enfermedades cardiovasculares (73). En edades tempranas la presencia de SM es la antesala para el desarrollo de DT2. En los países desarrollados el SM se presenta en el 25% de la población, aunque la prevalencia aumenta de manera paralela con la prevalencia de DT2 y obesidad. En México la prevalencia de SM en adultos es del 45% (52). Los datos disponibles de estudios de familias y poblacionales muestran que la RI está influenciada por un fuerte componente genético con una gran variabilidad entre diferentes grupos étnicos (74). De hecho, se ha demostrado que el 45% de los familiares de primer grado de pacientes con DT2, incluso con niveles de glucosa normales, presentan RI, la heredabilidad de cada uno de los componentes del SM puede alcanzar el 50%, mientras que la combinación de los componentes del SM se hereda de un 13-30%, por lo que estas variaciones explican una pequeña parte del fondo genético común del SM que son resultado de diferentes estrategias como análisis de ligamientos, estudios de genes candidato y GWAS (75), sin embargo, las variantes asociadas a la fecha a SM se localizan en los genes que regulan el metabolismo de lípidos o cercano a ellos, dejando fuera posibles biomarcadores genéticos de susceptibilidad al desarrollo de SM (76). A la fecha existen más de 89 trabajos que estudian las bases genéticas del SM, los cuales coinciden en veinticinco genes de susceptibilidad y donde solo ocho polimorfismos (rs9939609 de *FTO*, rs7903146 de *TCF7L2*, C56G y T1131C de *APO5*, C482T y C455T de *APOC3*, 174G>C de *IL6* y Taq-1B de *CETP*) en su mayoría implicados en el metabolismo de lípidos han replicado la asociación con el desarrollo de SM (77).

En el caso del SM pediátrico este es un problema global de salud, que no ha sido bien caracterizado en términos de criterios, prevalencia o implicaciones clínicas en niños y adolescentes (71). En los últimos años en los niños se ha visto un



aumento dramático de la RI de la mano de la obesidad, sin embargo, la RI también se encuentra presente en niños con peso normal, con una historia familiar de DT2, hipertensión arterial y dislipidemias (78). En niños la hiperglucemia es una manifestación tardía de la RI, llevando al concepto que los factores implicados en el desarrollo de RI son comunes con el origen del SM, la predisposición es el trasfondo de las teorías genéticas sobre el origen de la RI y el SM en donde los procesos de adaptación incluirán anomalías genéticas de una o más proteínas de la cascada de señalización de la insulina que llevarán a errores en la señalización y acción hormonal que desembocarán en el desarrollo del SM como antesala de la DT2 y ECV (79, 80). Con base a lo anterior la resistencia a los efectos biológicos de la insulina es la característica clave del SM y constituye la patogénesis de la DT2, si bien el páncreas aumenta la secreción de insulina al torrente sanguíneo para compensar los defectos en la acción de la insulina periférica, esta compensación mantenida conlleva a hipertrofia de la célula  $\beta$  e intolerancia a la glucosa. En los adipocitos y miocitos la insulina regula el transporte de glucosa controlando la translocación de GLUT4, además la RI tiene un papel crítico en el metabolismo de los lípidos al estimular la lipogénesis y la supresión de la lipólisis, lo que provoca un aumento en las concentraciones de c-VLDL, triglicéridos y disminución de las concentraciones de c-HDL (81), la RI también se asocia a HTA debido a que aumenta la absorción de sodio renal y el tono simpático, provocando una vasodilatación alterada con una secreción deficiente de óxido nítrico que conduce a alteraciones permanentes como aterosclerosis e hipertensión (82). Por último, la obesidad que es un estado de inflamación crónica, que inhibe la capacidad de señalización de la insulina en los adipocitos y hepatocitos a través de la inhibición del IRS-1 (receptor de la insulina sustrato 1) y el receptor de la insulina en la vía de señalización de la insulina (83, 84). Lo anterior sugiere una evidencia clara del papel de la RI en el desarrollo del SM.

## **I.6 Genética de la resistencia a la insulina**

La RI es el resultado de la interacción de factores ambientales y genéticos, sin embargo, el conocimiento completo de los antecedentes genéticos de esta

condición sigue siendo desconocido (85). Los estudios genéticos se han enfocado en proporcionar evidencia de la asociación de variantes genéticas con la enfermedad, no obstante, los avances en el descubrimiento de variantes involucradas en el desarrollo de enfermedades complejas de manera puntual la RI aún son críticos (86). Hasta el momento los GWAS han identificado 88 *locis* asociados con el desarrollo de DT2, la gran mayoría de los *locis* identificados están relacionados con la secreción de la insulina, la función de las células  $\beta$  y por ende la RI (87). A pesar de estos avances, los *locis* identificados sólo explican del 25-44% de la heredabilidad de la RI, esto plantea la necesidad de explorar la contribución de las variantes de baja frecuencia ( $\leq 5\%$ ) y variantes raras ( $\leq 0.5\%$ ) en la heredabilidad de RI y DT2 (88). El desarrollo de nuevas herramientas de análisis genómico ha revolucionado el análisis del genoma humano, lo que a transformado el estudio de las enfermedades genéticas complejas. La mayoría de las variantes genéticas asociadas a DT2 están implicadas en la función de la célula  $\beta$ , apoyado por los resultados de estudios en personas delgadas con DT2 donde evidencia el papel de la secreción alterada de la insulina (89).

A la fecha más de 16,360 polimorfismos se han asociado nominalmente a DT2 en más de 599 publicaciones, con la introducción de nuevos enfoques analíticos y con la integración del análisis de genoma con los rasgos cuantitativos de la RI, se tienen identificados 38 *locis* de susceptibilidad a DT2 involucrados en las vías de secreción de la insulina (90) sin embargo, la mayoría de estos *locis* han sido identificados solo en población de ascendencia Europea (91). En el 2014 se identificaron 19 polimorfismos asociados con los niveles de insulina, diez de los cuales también se asociaron con un perfil dislipidémico que sugiere un papel de la RI en el metabolismo de lípidos, entre los que se incluye a las proteínas de unión a ácidos grasos, en especial las FABP1-4 que desempeña un papel fisiológico en la captación, metabolismo intracelular y la excreción de ácidos grasos de cadena larga, los polimorfismos de estos genes han sido asociados a hipertrigliceridemia y disminución de la sensibilidad a la insulina (92). La elongasa de la familia 6 de ácidos grasos de cadena larga ha sido relacionada a la RI, los portadores de los polimorfismos rs9997926 y rs6824447 presentan mayor HOMA-IR (93). Los

polimorfismos relacionados con el metabolismo de glucosa y asociados con RI de los cuales UPC2, UPC3, asociados con niveles elevados de insulina y RI (94), el *ADRB1* donde el polimorfismo (R389C) se asoció con HOMA-IR en población africana y europea (95). Otro ejemplo es la apolipoproteína E que está involucrada en la homeostasis de los lípidos en plasma y ha sido asociada a RI, sensibilidad a la insulina, sin embargo, los resultados no replican en las diferentes poblaciones (96). Por otro lado, se encuentran los polimorfismos en el gen de la adiponectina (*APM1*, *ADIPOQ*, *ACRP30*) y sus receptores (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*), los cuales están fuertemente asociados a obesidad y resistencia a la insulina (97). Estos son algunos ejemplos de los 70 polimorfismos asociados a DT2 que dependen de la función de la célula  $\beta$ , con base en estos puntos se seleccionaron los siguientes siete polimorfismos para evaluarlos en la población infantil:

**Tabla 1. Descripción de los polimorfismos seleccionados**

Cromosoma	Gen	Función	Variante	Efecto del alelo de riesgo	Población	Referencia
9p21	<i>CDKN2A/2B</i>	Gen supresor de tumor, inhibe a la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4)	rs10811661	↓ Secreción de insulina; ↓ función de la célula β	Danesa Noruega Francesa Coreana Japonesa China Mexicana	(98-102)
10q25.3	<i>TCF7L2</i>	Regulación de la expresión del gen del proglucagón	rs7903146	↓ Concentración y secreción de insulina	Islandesa Danesa Norteamericana Caucásica China	(103, 104)
9q31.1	<i>ABCA1</i>	Transporte de colesterol y fosfolípidos a través de la membrana plasmática	rs9282541	↑ Índice de masa corporal ↓ c-HDL  Diabetes tipo 2	Mexicana	(102, 105-107)
2q36	<i>IRS1</i>	Gen que codifica para una proteína que media el control de la insulina.	rs4675095	↓ Secreción de insulina  Diabetes tipo 2	Escandinava Japonesa Japonesa-Americana Finlandesa	(108, 109)
11p15.5	<i>KCNQ1</i>	Contribuye a la regulación de la secreción de insulina.	rs2237895	↓ Secreción de insulina;  Diabetes tipo 2	Coreana Japonesa China India	(110-112)
7q32.2	<i>KLF14</i>	Regulador maestro de la expresión de genes en tejido adiposo	rs972283	Diabetes tipo 2 Diabetes gestacional	Danesa Mexicana Caucásica	(113-115)
2p23.3	<i>GCKR</i>	Liberación de insulina estimulada por los niveles de glucosa	rs780094	↑ Concentración de glucosa y triglicéridos	Caucásica Danesa Húngaros	(113, 116, 117)

## I.7 Genética de la población mexicana

El genoma humano se hereda de padres a hijos, por lo que las variaciones genómicas se conservan en las familias y en las poblaciones, lo que resulta evidente al observar las características físicas de los miembros de una familia o de alguna comunidad. En consecuencia, la frecuencia de SNPs que confieren susceptibilidad o resistencia a enfermedades comunes, o que contribuyen a la respuesta a fármacos, son distintas en cada población (118). México es un mosaico poblacional con una población aproximada de 120.8 millones de

habitantes conformada principalmente por orígenes ancestrales: nativo-americano (45%), europeo (50%) y con bajos niveles de ascendencia africana (5%), donde se han identificado 11 familias lingüísticas indoamericanas, 68 agrupaciones lingüísticas correspondientes a dichas familias, y 364 variantes lingüísticas pertenecientes a este conjunto de agrupaciones (119, 120). Un estudio realizado por Moreno y col. reporta un alto grado de diferenciación entre las poblaciones nativas de México aunado a la existencia de tres patrones geográficos de subestructura poblacional, la zona norte, centro/sur y sureste (121). Esta arquitectura genética podría tener una implicación en las enfermedades por lo que es importante la caracterización genética de los fenotipos que conduzcan a la identificación de variantes genéticas asociadas con rasgos clínicos y biológicos (122), como es el caso de la variante R230C de *ABCA1* involucrada en el desarrollo de DT2 en la población indígena Maya (102, 123).

### **I.8 Importancia del estudio de RI en población Maya a través de herramientas genómicas de nueva generación**

Actualmente, se han llevado a cabo varios estudios de variantes polimórficas asociadas a alteraciones metabólicas en distintas poblaciones del mundo. Sin embargo, es necesario evaluar a cada población de manera independiente debido a la diversidad genética que existe entre ellas. La elevada diversidad de la población mexicana la hace única en comparación con otras poblaciones, aunque la ascendencia genética europea es cercana al 50% en el mestizo mexicano, no todos los alelos de riesgo asociados a enfermedades complejas responden en la población mexicana, tomando como base los resultados del GWAS realizado en diabéticos mexicanos el cual demostró la replicación de solo cuatro regiones génicas de un total de 46 regiones reportadas en la literatura para otras poblaciones (124), otro trabajo reveló que de 68 polimorfismos en 41 genes sólo 26 polimorfismos genéticos fueron asociados a DT2 en la población mexicana (6). Estos resultados evidencian la necesidad del estudio de genes asociados a RI en indígenas mexicanos que contribuyan a su vez a conocer el posible origen de las enfermedades. Dentro de esta diversidad de grupos, se eligió a la población maya

por ser uno de los principales grupos indígenas de México, el segundo grupo más numeroso con un millón y medio de individuos, después de los nahuas además de ser considerada como la civilización más deslumbrante de la América precolombina. La población Maya se localiza en la península de Yucatán, siendo Campeche y Yucatán dos de los estados con mayor prevalencia de obesidad en niños de 5 a 11 años (ENSANUT 2016) e incluso, la Secretaría de Salud del Estado ha anunciado una elevada prevalencia de diabetes, hipertensión y obesidad en población adulta. Por lo tanto, es necesario el estudio de variantes polimórficas propias de la población maya-mestiza involucradas en el desarrollo de RI y SM en niños, resaltando la importancia de realizar este estudio en niños, que han estado menos tiempo expuesto a los factores ambientales y si alguna alteración se presenta podría ser indicativo de un posible componente genético relevante (125). Tomando ventaja de las nuevas tecnologías de secuenciación, de manera particular la secuenciación de exoma que es diferente de otros tipos de pruebas de diagnóstico genético en términos del número de genes que son secuenciados simultáneamente, la ventaja de esta prueba es que va dirigida a las regiones codificantes de los genes, lo que una brinda mayor posibilidad de identificar las variantes genéticas del SM en un individuo afectado (126). Sin embargo, abordar al SM es muy complicado dada la complejidad de los parámetros de descontrol involucrados, así como la interacción y origen de cada uno de ellos, sin contar el número tan grande de definiciones que actualmente se tienen para su diagnóstico (71). Así que en el presente estudio tomamos como base el componente que originó la propuesta de la existencia del SM que es la RI. De esta manera se propuso evaluar los SNPs previamente reportados en otras poblaciones como asociados a RI y DT2, además de buscar mediante la secuenciación de exoma completo la identificación de variantes propias de la población Maya. En conjunto los hallazgos contribuirán a discernir sobre el fondo genético de la RI con una estrategia que al abordar la investigación en niños revela el impacto de portar SNPs a edades tempranas que incrementan la susceptibilidad a presentar RI condición de la cual derivan los componentes del SM.

## **II. Justificación**

La RI es una entidad clínica y multifactorial condicionada por la suma de factores ambientales y genéticos. La RI desempeña un papel importante en el desarrollo de las alteraciones metabólicas que conforman al SM. Siendo la RI por si misma o como eje central del SM, la antesala del desarrollo de DT2 y ECV, dos de las principales causas de muerte en México y el mundo. La RI está presente tanto en adultos como en la población infantil, aún sin presencia de obesidad. El aumento de malnutrición está acompañado de un aumento en las prevalencias de RI y DT2, donde la población más vulnerable de México son los grupos indígenas, que en los últimos años han sufrido un aumento en la prevalencia de obesidad y DT2 precedido con toda seguridad por la RI, lo que plantea la necesidad de conocer los factores genéticos involucrados en el desarrollo de esta entidad. Tomando en cuenta que la mayoría de los estudios genéticos de susceptibilidad a DT2 y RI están dirigidos a la población adulta lo cual puede mostrar resultados condicionados por una mayor exposición a los factores ambientales, se planteó enfocar este estudio a la población infantil con la finalidad de delimitar considerablemente la participación del medio ambiente en la aparición de las manifestaciones fenotípicas de la RI y revelar la contribución del componente genético en la susceptibilidad a desarrollar RI. Los resultados de este trabajo ayudarán a dilucidar los mecanismos que conducen a esta condición, a la vez que puedan contribuir al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, blancos terapéuticos y medidas preventivas a corto y largo plazo.

### **III. Hipótesis**

Se encontrarán variantes genéticas asociadas a la resistencia a la insulina en la población maya.



## **IV. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo general**

Identificar variantes genéticas asociadas a resistencia a la insulina en niños mayas.

### **IV.2 Objetivos particulares**

- ✓ Determinar la frecuencia de resistencia a la insulina en niños Mayas de la Península de Yucatán.
- ✓ Determinar si los polimorfismos rs4675095 de *IRS*, rs10965250 de *CDKN2A/2B*, rs2237895 de *KCNQ1*, rs9282541 de *ABCA1*, rs780094 de *GCKR*, rs972283 de *KLF14* y el rs7903146 de *TCF7L2* se encuentran asociados a la resistencia a la insulina en niños Mayas.
- ✓ Identificar variantes genéticas propias asociadas a resistencia a la insulina en niños Mayas a través de la secuenciación del exoma completo.

## V. Material y métodos

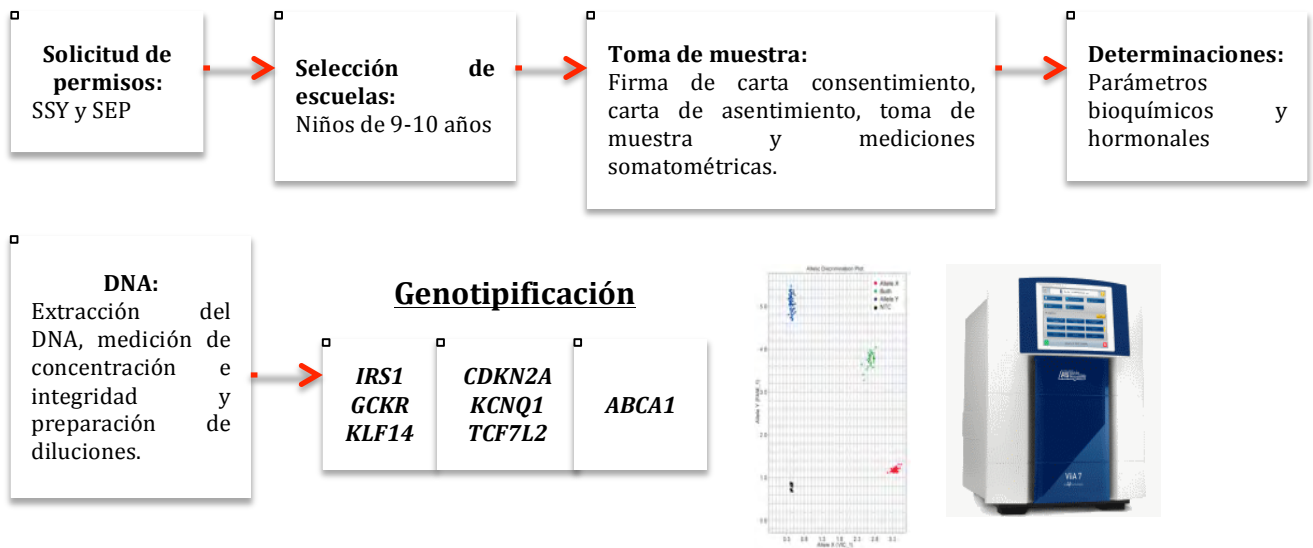
### V.1 Tipo de estudio

Estudio poblacional, transversal de casos y controles.

### V.2 Diseño de estudio:

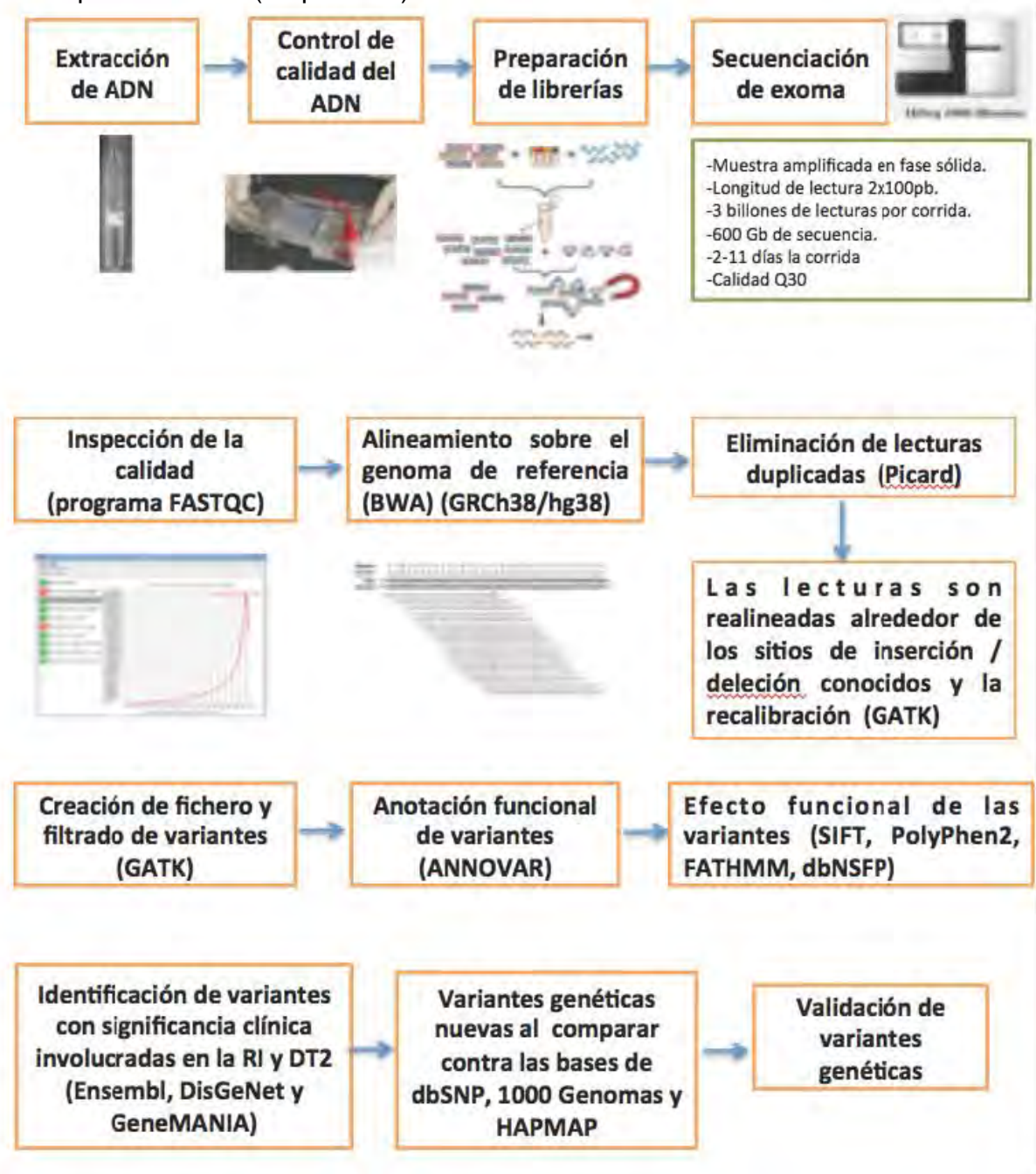
El estudio se diseñó en dos etapas.

**Primera etapa:** Determinación de la asociación de polimorfismos conocidos con la RI (esquema 1).



Esquema 1. Diseño experimental primera etapa

**Segunda etapa:** Identificación de nuevos polimorfismos asociados a RI en fenotipos extremos (esquema 2).



**Esquema 2. Diseño experimental segunda etapa**

### V.3 Tamaño de la muestra

En la primera etapa se evaluaron 375 niños de 9 a 10 años edad de cuarto grado de primaria, de la Península de Yucatán. Residentes de las comunidades de Eknakán, Nochakán, Cuzamá, Pomuch, Hecelchakan y Ukum.

El tamaño de muestra fue calculado de acuerdo con la ecuación para una población finita con 95 % de confianza y una precisión del 4%.

Se empleó la siguiente fórmula para el cálculo del tamaño de la muestra:

$$n = \frac{z^2 pq}{B^2}$$

Donde:

**n**= Tamaño de la muestra,

**z**= 1,96 para el 95% de confianza, 2,56 para el 99%

**p**= Frecuencia esperada del factor a estudiar (45%)

**q**= 1- p

**B**= Precisión o error admitido

### V.4 Definición de fenotipo extremo

Para la segunda etapa, los niños fueron estratificados con base al fenotipo extremo de RI en dos grupos:

- HOMA-IR > 95%
- HOMA-IR < 95%

### V.5 Criterios de inclusión

- ✓ Niños de cuarto a sexto año de primaria (9-10 años), residentes de la Península de Yucatán.
- ✓ Que alguno de sus familiares directos hable Maya.
- ✓ Que los padres y abuelos hayan nacido dentro de la comunidad indígena Maya sin cambios de residencia de los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo.
- ✓ Tener mínimo 10 horas de ayuno.
- ✓ Sin restricción de género.
- ✓ Contar con el consentimiento firmado por sus padres.

- ✓ Contar con la carta de asentimiento firmada por el participante.

## **V.5 Criterios de exclusión**

- ✓ Tener más de 10 años.
- ✓ Estar bajo algún tratamiento para control de glucosa, colesterol o triglicéridos.
- ✓ No contar con el consentimiento informado firmado por sus padres.
- ✓ Enfermedades metabólicas asociadas.
- ✓ No dar el asentimiento para la toma de muestra sanguínea.

## **V.6 Datos generales, medidas somatométricas y muestras sanguíneas**

Todos los participantes del estudio accedieron previo asentimiento informado y con la autorización de sus padres a través de un consentimiento informado mediante firma o huella digital. Los datos generales fueron recopilados mediante la aplicación de un cuestionario a los padres de familia y con apoyo de un intérprete cuando fue necesario.

Las mediciones antropométricas fueron realizadas por dos evaluadores previamente entrenados. A cada participante se le midió la cintura (cm), la cadera (cm), el peso (kg) y la talla (m), después se calculó el índice de masa corporal (IMC) en percentiles con el programa Pediatric Zcore Calculator (<http://zscore.research.chop.edu/>) y se cálculo el índice cintura cadera (ICC), de acuerdo a las normas antropométricas internacionales.

La PA fue evaluada mediante baumanómetros digitales infantiles previo reposo del niño de al menos 10 minutos y por duplicado después se cálculo el percentil de PA con el programa Body composition laboratory (<https://www.bcm.edu/bodycomplab/Flashapps/BPVAgeChartpage.html>). Para la extracción de sangre se tomó en cuenta un ayuno de 10 a 12 horas. Se tomaron 7 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante para realizar un perfil bioquímico y 2 tubos con EDTA de 4 mL para el análisis genético. Las muestras fueron etiquetadas, almacenadas y conservadas debidamente hasta su fecha de proceso.

## V.7 Determinaciones bioquímicas

Se midió la concentración sérica de glucosa, colesterol, c-HDL, c-LDL y triglicéridos por métodos colorimétricos estándar. Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por el método de Quimioluminiscencia.

## V.8 Análisis molecular

A partir de la muestra de sangre con EDTA se extrajo el DNA de leucocitos por un método estándar. El DNA se cuantificó espectrofotométricamente (260/280nm). La integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1.5%, 50ng de DNA fueron empleados para la generación de librerías, el resto fue utilizado para la genotipificación por PCR en tiempo real. Los polimorfismos estudiados se muestran a continuación (primera etapa):

<b>Gen</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Número de catálogo AB</b>
<i>IRS</i>	rs4675095	C_27974511_10
<i>CDKN2A</i>	rs10965250	C_31288922_10
<i>KCNQ1</i>	rs2237895	C_16171034_10
<i>ABCA1</i>	rs9282541	C_11720861_10
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	C_29347861_10
<i>GCKR</i>	rs780094	C_2862873_10
<i>KLF14</i>	rs972283	C_7614445_10

## V.9 Generación de librerías y secuenciación

Antes de la secuenciación es necesario realizar la captura de las regiones codificantes del DNA genómico que se quiere analizar. Para ello se requiere romper el DNA genómico para conseguir fragmentos de un determinado tamaño que se puedan purificar, para crear librerías de exómicas.

### Creación de librerías

Las librerías fueron creadas con el kit de Nextera que se basa en cinco puntos principales:

- a) Fragmentación y etiquetado: el DNA genómico se fragmenta y etiqueta de forma simultánea mediante un transposoma, el DNA fragmentado y

etiquetado se amplifica y se añaden índices de secuenciación mediante PCR (primera amplificación).

- b) Muestra para el enriquecimiento: se agrupan hasta doce bibliotecas, se concentra el grupo y se desnaturalizan las bibliotecas para convertirlas en DNA de una sola cadena.
- c) Hibridación de sondas para regiones objetivo (dos rondas): se emplean sondas etiquetadas con biotina específicas para las regiones de interés en el DNA fragmentado. El grupo se enriquece en las regiones deseadas mediante bolas de estreptavidina que se unen a las sondas con biotina.
- d) Captura de regiones: Los fragmentos de DNA con biotina unidos a las bolas de estreptavidina se extraen de la solución por medios magnéticos.
- e) Elución de bibliotecas enriquecidas: Los fragmentos de DNA enriquecidos se eluyen desde las bolas y se siguen amplificando por PCR (segunda amplificación), las bibliotecas amplificadas se recogen y se preparan para la secuenciación.

### **Secuenciación**

En este trabajo se utilizó la tecnología de Illumina HiSeq2000, la cual combina la amplificación de moléculas individuales de DNA en fase sólida y una amplificación en paralelo de todas las moléculas de DNA unidas a los soportes sólidos. Utiliza terminadores reversibles, que son nucleótidos modificados de forma que se le une una molécula fluorescente que no permite continuar la incorporación del siguiente nucleótido a la cadena hasta que no es retirada. Los ciclos se componen de: incorporación del nuevo nucleótido protegido con un grupo fluorescente a la cadena en formación, lavado del resto de nucleótidos no unidos, lectura de la señal fluorescente y posterior retirada del grupo protector para permitir la unión del siguiente nucleótido.

## **V.10 Análisis de exoma**

En el genoma humano hay alrededor de 18,000 exones, estos constituyen aproximadamente el 1% del genoma, esto se traduce en 30 megabases de longitud. El análisis de secuencias de exoma se divide en tres pasos importantes:

- Control de calidad y análisis de imágenes
- Alineamiento contra el genoma de referencia
- Llamado de variantes

### **Control de calidad y el análisis de imágenes**

El análisis de calidad de la secuencia se realiza mediante el programa informático fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), este programa permite analizar la calidad de la secuencia generada, adjudicándole un índice de calidad (score) tanto a las secuencias individuales como a las bases de cada secuencia en función de su posición, esta calidad de lecturas se expresa en base logarítmica. Así, una calidad Q20 significa una posibilidad de 0.01 de haber leído una base erróneamente. Q30 traduciría una posibilidad de error de 0.001 y así sucesivamente. Esto permite decidir si se utiliza la secuencia completa o se eliminan los extremos si la calidad en estos disminuye. Es útil en secuencias superiores a los 50 nucleótidos, en general fastQC proporciona el análisis global de la calidad de las secuencias antes de utilizarlas con otros programas.

El programa fastQC proporciona los siguientes datos:

- Estadísticas básicas. Presenta las características básicas de la secuencia.
- Calidad de la secuencia por base. Gráfica que muestra la calidad de las bases según la posición de lectura.
- Puntuaciones de calidad por secuencia. Gráfica que representa la distribución de la calidad de las lecturas. Los datos serán mejores cuantas más lecturas tengan buena calidad.
- Contenido de bases en la secuencia. Muestra la frecuencia de cada base en cada posición de lectura. El programa muestra un error cuando la diferencia entre A y T o G y C es mayor del 20% en alguna de las posiciones de lectura.



- Contenido de GC por base. Muestra la distribución de GC por posición de lectura. La aparición de desviaciones puede deberse a la presencia de alguna secuencia sobre representada en la biblioteca.
- Contenido de GC por secuencia. Muestra la distribución de GC por secuencia.
- Contenido de N por base. Se utiliza N para marcar las bases de las que no se ha obtenido lectura. Cuantas más N contengan los datos su calidad será menor.
- Distribución de la longitud de secuencias. La gráfica muestra las longitudes de las lecturas en pares de bases (bp).
- Niveles de duplicación de secuencias. Muestra el grado de duplicación de cada secuencia. Cuanto menor es este número, mejor es la calidad de los datos, y suele traducir un adecuado nivel de cobertura de las secuencias diana.
- Secuencias sobre representadas. Informa de la presencia de secuencias que aparecen en mayor cantidad de la esperada (>0.1%). El programa requiere que los fragmentos tengan al menos 20 pares de bases.
- Contenido en Kmeros. El Kmer se refiere a oligómeros específicos (de longitud-k) que se pueden utilizar para localizar regiones de interés.

### **El alineamiento contra el genoma de referencia**

El alineamiento de secuencias consiste en mapear los datos crudos almacenados en formato FASTQ contra una secuencia de referencia (GRCh38/hg38) para obtener la secuencia de DNA original. Existen diferentes algoritmos para la alineación (MAQ, BWA, Bowtie). En este trabajo se empleó el software BWA (Burrows-Wheeler Aligner), por su rapidez y precisión (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). El alineamiento de los archivos FASTQ con BWA genera dos archivos en formato .sai, que son transformados en un único archivo en formato .sam (Sequence Alignment/Map), y finalmente, con el programa Picard (<http://picard.sourceforge.net/>), en un formato BAM (forma binaria de los archivos sam) se localizan y eliminan las secuencias duplicadas, el siguiente paso fue realizar la identificación de todas las variaciones presentes en cada exoma, utilizando el programa GATK (Genome Analysis Tool Kit <http://www.broadinstitute.org/gatk/>) este programa permitió identificar las regiones

que requieren un re-alineamiento por la presencia de inserciones que no existen en el genoma de referencia, esto es indispensable para minimizar el riesgo de falsos positivos al buscar variantes, por último se recalibran los valores de calidad utilizando covariantes específicas y enmascarando los SNPs ya conocidos (dbSNP132).

### **Llamado de variantes**

Todas las variaciones presentes en cada individuo se extrajeron del archivo anterior empleando la herramienta Unified Genotyper utilizando un archivo de referencia como comparación y dando lugar a un archivo VCF (Variant Call Format).

### **Anotación funcional de las variantes encontradas**

Esta etapa es la más importante ya que ayuda a identificar las variantes funcionalmente importantes, existen diferentes herramientas para filtrar y anotar estas variantes (ANNOVAR y VEP), ambas sirven para anotar variantes de un solo nucleótido único (SNVs) e inserciones/delecciones además de conocer su consecuencia funcional. Con la finalidad de encontrar variantes asociadas con la enfermedad se aplicaron diferentes filtros, entre ellos las variantes debían estar en equilibrio de Hardy-Weinberg, estar en desequilibrio de ligamiento ( $>0.8$ ), la frecuencia del alelo menor ( $<0.5$ ), no se consideraron las inserciones/delecciones y sólo se conservaron las variantes con un máximo de dos alelos. Por otra parte, se suprimieron las variantes con lecturas menores a 10, y con valores de calidad por debajo de 50. Por último, se descartaron las variantes asociadas a RI presentes en los controles.

### **Selección de variantes asociadas a RI**

Esté trabajo se enfocó en la búsqueda de polimorfismos asociados a RI y DT2, la selección de variantes se basó en las puntuaciones de cuatro programas de predicción. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), PolyPhen 2 (Polymorphism Phenotyping v2) y dbNSFP (database for nonsynonymous SNPs' functional predictions) tiene puntuaciones de 0 a 1 en este trabajo una puntuación mayor a

0.8 fue considerada como patógena (127-130), en el caso de FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models) el resultado es categórico (131). El polimorfismo debía estar presente sólo en los casos además de que en tres de los cuatro programas de simulación empleados debía ser positivo para la alteración (SIFT, Polyphen2, FATHMM y dbNSFP), estos programas tienen la ventaja de distinguir entre variantes involucradas con la patología y polimorfismos neutros. El programa SIFT ha demostrado que el número de falsos positivos es del 20%, dado principalmente por variantes no sinónimas, a pesar de estos datos se considera a este programa confiable y con un alta sensibilidad (130), Polyphen2 es una herramienta que predice el posible impacto del cambio de un aminoácido en la estructura y función de la proteína, la sensibilidad de esta herramienta es del 68%, sin embargo, su especificidad es del 18%, debido a la baja especificidad los resultados deben interpretarse con precaución, es por ello la necesidad de mayor evidencia para aceptar o rechazar la asociación de las variantes con la enfermedad (128, 129). Otra herramienta utilizada para la predicción de efectos funcionales de las variantes es el FATHMM, es un método automatizado capaz de distinguir con mayor precisión y fiabilidad entre SNP patógenos y de función neutra, la ventaja de esta herramienta es que se basa en modelos ponderados para predicciones de cambios, los estudios demuestran que tiene un mayor rendimiento en comparación con los métodos de predicción tradicionales, sin embargo, un trabajo reporta que el porcentaje de falsos positivos es de 22.8% (131). Por último se utilizó el dbNSFP que compila el puntaje de predicción de cuatro algoritmos: SIFT, Polyphen2, LRT y MutationTaster la ventaja sobre las otras herramientas es que integra datos de múltiples algoritmos de predicción funcional y lo compara con una amplia base de variantes no sinónimas lo que otorga una ventaja al momento de analizar la información en conjunto (127). Una vez identificadas las variantes con un posible efecto funcional en la RI y DT2 se procedió a buscar la significancia clínica en los programas Esembl (132), DisGeNet (133) y en GeneMANIA (134) con lo anterior se realizó un esquema para ilustrar que las variantes están implicadas tanto en RI como en DT2.

## **V.11 Análisis estadístico**

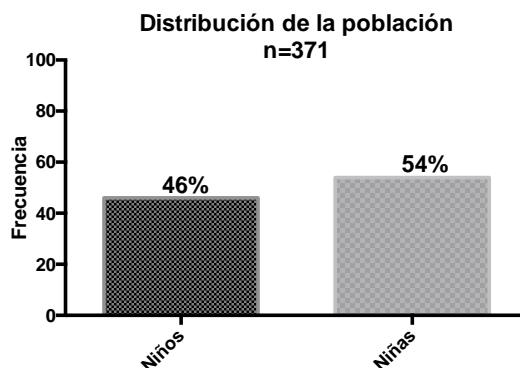
Los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico para ciencias sociales versión 22 (SPSS 22, por sus siglas en inglés). El análisis descriptivo las variables nominales se expresaron como frecuencias y la comparación de frecuencias se realizó por medio de la prueba de  $\chi^2$ . Se determinó la distribución de los datos con una prueba de Kolmogorov y con base en su distribución se emplearon pruebas paramétricas (t-Student y ANOVA) y pruebas no paramétricas como la U Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado usando el programa en línea (<http://www.genes.org.uk/software/hardy-weinberg.shtml>). La asociación de cada SNP se realizó por medio de un análisis multivariado ajustado por edad, género e pIMC también se empleó una regresión logística bajo el modelo dominante y recesivo ajustado por edad, sexo y pIMC.

## VI. Resultados

### Primera etapa

#### Descripción de la población

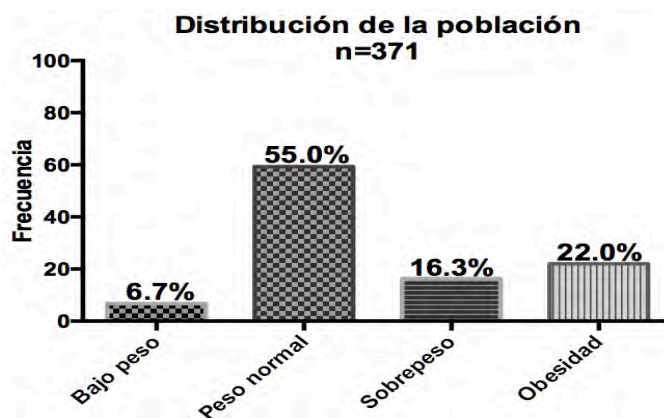
La distribución de acuerdo al sexo de los 371 niños evaluados se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1: Distribución por sexo

#### Estratificación de la población de acuerdo al IMC

Se estratificó la población de acuerdo con el percentil de IMC y se encontró una frecuencia de sobrepeso y/o obesidad de 38.3%, cifra superior a lo reportado en las últimas encuestas de salud (gráfica 2).



Gráfica 2: Distribución de acuerdo al percentil de IMC

## Descripción de los parámetros bioquímicos y somatométricos de la población general

La Tabla 2 muestra la frecuencia de alteraciones en parámetros bioquímicos, somatométricos y hormonales de los 371 niños evaluados comparada con lo reportado en otros estudios realizados en niños mexicanos.

**Tabla 2. Descripción de los parámetros bioquímicos y somatométricos de la población general**

<b>Característica (n= 371)</b>	<b>Mediana (P25, P75)</b>	<b>Punto de corte</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Literatura</b>
Edad	10 (9, 11)			
pCintura	55 (31, 86)	>75	44.2%	25%
pPA	61 (50, 90)	>90	31.3%	8.9%
Glucosa (mg/dL)	92 (85, 97)	>100mg/dL	15.4%	1.2%
Colesterol (mg/dL)	151 (134, 175)	>200mg/dL	7.8%	5%
		>150mg/dL	72%	9.1%
Triglicéridos (mg/dL)	104 (83, 141)	>100mg/dL	51.2%	27%
HDL (mg/dL)	45 (39, 53)	>50mg/dL	78.7%	15.1%
LDL (mg/dL)	88 (73, 105)	>100mg/dL	29.6%	10%
Urea (mg/dL)	32 (27, 34)	>40mg/dL	1.8%	
Creatinina (mg/dL)	0.44 (0.4, 0.5)	<0.5mg/dL	64.4%	
Ácido úrico (mg/dL)	4 (3.3, 4.8)	>6.0 mg/dL	1.9%	
AST (mg/dL)	28 (26, 33)	>40mg/dL	12%	
ALT (mg/dL)	17 (14, 21)	>50mg/dL	8%	
Insulina (uU/mL)	8.9 (4.6, 14)			
%HOMA-IR	69 (35, 98)			

Estadística descriptiva no paramétrica (mediana, percentil 25 y 75)

### Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por sexo

En la Tabla 3 se muestran las características somatométricas, bioquímicas y hormonales de los 371 niños estratificados de acuerdo al sexo.

**Tabla 3. Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por sexo**

<b>n= 371</b>	<b>Niñas (54%)</b>	<b>Niños (46%)</b>	<b>P</b>
Cintura (cm)	67 (61, 74)	65 (59,73)	0.107
pCintura	<b>55 (31, 86)</b>	<b>50 (25, 75)</b>	<b>0.012</b>
Peso (Kg)	36.1 (30, 42)	32 (27, 40.4)	0.083
Talla (cm)	138.2 (131, 145)	136 (129, 143)	0.075
pIMC	<b>67.5 (36, 89)</b>	<b>51 (20, 87)</b>	<b>0.022</b>
pPA	60.5 (50, 90)	64 (50, 90)	0.310
Glucosa (mg/dL)	<b>91 (83, 96)</b>	<b>93 (88, 99)</b>	<b>0.001</b>
Colesterol (mg/dL)	149 (131, 172)	151 (134, 175)	0.298
Triglicéridos (mg/dL)	<b>104 (83, 141)</b>	<b>96 (73, 129)</b>	<b>0.008</b>
HDL (mg/dL)	<b>45 (39, 53)</b>	<b>49.4 (43.5, 58)</b>	<b>0.0001</b>
LDL (mg/dL)	88 (73, 105)	85.6 (74.3, 104.5)	0.923
Urea (mg/dL)	32 (27, 34)	34 (24, 34)	0.078
Creatinina (mg/dL)	<b>0.44 (0.4, 0.5)</b>	<b>0.47 (0.41, 0.52)</b>	<b>0.004</b>
Ácido úrico (mg/dL)	3.9 (3.6, 4.7)	4 (3.3, 4.8)	0.869
AST (mg/dL)	<b>28 (25, 30)</b>	<b>30 (27, 34)</b>	<b>0.012</b>
ALT (mg/dL)	17 (14, 20)	17 (19, 23)	0.595
Insulina (uU/mL)	<b>8.9 (4.6, 14)</b>	<b>6.3 (3.3, 9.8)</b>	<b>0.0001</b>
%HOMA-IR	<b>69 (34.5, 98)</b>	<b>52 (28, 80)</b>	<b>0.0001</b>

Prueba de distribución normal Kolmogorov, comparación de grupos por U-Mann-W.  $P < 0.05$

### Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por escuela

La Tabla 4 muestra los resultados de los parámetros bioquímicos, somatométricos y hormonales estratificados por escuela.

**Tabla 4. Comparación de los parámetros bioquímicos y somatométricos por escuela**

n=371 (M/F)	LAE n=91 (42/41)	RS n=41 (17/24)	HEZ n=80 (38/42)	MC n=83 (38/45)	JSM n=76 (36/40)	p
Cintura (cm)	62 (57, 72)	63 (57, 64)	74 (65, 81)	68 (63, 77)	64 (59, 69)	0.0001
pCintura	50 (10, 75)	50 (25, 75)	75 (50, 90)	50 (25, 75)	50 (25, 75)	0.001
Peso (Kg)	32 (28, 40)	32 (28, 39)	41 (35, 49)	35 (31, 44)	29 (25, 37)	0.001
Talla (cm)	132 (128, 138)	134 (129, 139)	147 (140, 151)	141 (136, 148)	132 (125, 139)	0.0001
pIMC	71 (34, 90)	70 (35, 90)	65 (35, 91)	53 (21, 89)	41 (20, 71)	0.011
pPA	60 (52, 74)	70 (62, 82)	70 (50, 90)	50 (55, 90)	50 (62, 90)	0.054
Glucosa (mg/dL)	87 (82, 93)	78 (75, 87)	94 (89, 98)	99 (94, 103)	91 (85, 96)	0.0001
Colesterol (mg/dL)	144 (133, 162)	145 (129, 160)	164 (144, 188)	171 (148, 184)	132 (115, 148)	0.0001
Triglicéridos (mg/dL)	113 (90, 140)	111 (92, 148)	101 (72, 134)	102 (80, 149)	86 (69, 121)	0.0001
HDL (mg/dL)	44 (39, 51)	44 (40, 49)	49 (44, 49)	50 (43, 57)	46 (38, 56)	0.0001
LDL (mg/dL)	89 (73, 105)	91 (71, 101)	91 (75, 109)	93 (77, 108)	79 (68, 88)	0.001
AST (mg/dL)	28 (26, 33)	29 (26, 32)	27 (26, 32)	26 (25, 32)	29 (26, 32)	0.821
ALT (mg/dL)	18 (14, 21)	17 (14, 21)	18 (14, 21)	18 (15, 21)	18 (14, 21)	0.416
Insulina (uU/mL)	3.8 (2.8, 10)	3.9 (2.8, 8.1)	9.4 (6.2, 14)	10 (7.6, 16.9)	6.4 (4.5, 9.4)	0.0001
%HOMA-IR	28 (17, 77)	28 (17, 56)	76 (49, 95)	86 (66, 95)	52 (41, 90)	0.0001

Prueba de distribución normal Kolmogorov y Shapiro-Wilk, comparación de grupos por Kruskal-Wallis. P<0.05



## Frecuencias alélicas de los polimorfismos evaluados

Se realizó el análisis de frecuencias alélicas y se comparó con lo reportado para estos estudios en el proyecto 1000 genomas.

**Tabla 5. Frecuencias alélicas y comparación con el 1000 genomas**

SNP/gen	Frecuencia alélica (%)					
		Maya niños	AMR	EUR	AFR	EAS
<b>rs10811661</b>	C	13.4	13.5	16.5	5.3	43.7
<b>CDKN2A/2B</b>	T	86.6	86.5	83.5	94.7*	56.3*
<b>rs7903146</b>	C	91.5	75.4	69.3	71.5	97.2
<b>TCF7L2</b>	T	<b>8.5</b>	24.6*	30.7*	28.5*	2.8*
<b>rs9282541</b>	C	82	75.4	100	99.2	100
<b>ABCA1</b>	T	<b>18</b>	4.1*	0	0.8*	0
<b>rs4675095</b>	C	68.8	85	95	100	84
<b>IRS1</b>	T	<b>31.2</b>	15*	5*	0	16*
<b>rs2237875</b>	T	51.6	60	58	85	67
<b>KCNQ1</b>	C	<b>48.4</b>	40	42	15*	33*
<b>rs972283</b>	T	<b>67.5</b>	78	55*	93*	67
<b>KLF14</b>	C	<b>32.5</b>	22*	45*	7*	33
<b>rs780094</b>	C	51.9	60	41	75	69
<b>GCKR</b>	T	<b>48.1</b>	40	59*	15*	31*

Los alelos resaltados en negritas son los alelos de riesgo para DT2. \*P<0.05 niños Mayas vs. Poblaciones del proyecto 1000 Genomas (AMR= población de América; EUR= población Europea; AFR= población Africana; EAS= población de Asia del Este)

## Búsqueda de la asociación y correlación de los polimorfismos de la primera etapa con los parámetros bioquímicos y somatométricos

Dentro de la primera etapa se buscó la asociación de los polimorfismos de los genes seleccionados con las variables cuantitativas continuas, todos los polimorfismos evaluados muestran resultados significativos.

**Tabla 6. Asociaciones genotipo-fenotipo de rs10811661 de *CDKN2A/2B***

Parámetro	CC	CT/TT	P
c-LDL	77 (68-85)	89 (77-105)	0.006
Colesterol	143.4 (128-168.5)	151.6 (129-176)	0.006

Análisis multivariante con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs10811661 <i>CDKN2A/2B</i>	9	<u>C</u> <u>T</u>	Glucosa alterada en ayuno Glucosa>100mg/dL	0.003	1.42 (1.12-1.80)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 7. Asociaciones genotipo-fenotipo de rs7903146 de *TCF7L2***

Parámetro	CC	CT/TT	P
Triglicéridos	94 (75, 111)	104 (80, 141)	0.024

Análisis multivariante con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs7903146 <i>TCF7L2</i>	10	<u>C</u> <u>T</u>	Hipertrigliceridemia Triglicéridos>150mg/dL	0.043	2.66 (1.03-6.345)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 8: Asociaciones genotipo-fenotipo de rs9282541 de ABCA1**

Parámetro	CC	CT/TT	P
c-HDL	49 (53, 56)	45 (38, 53)	0.005
Insulina	7.2 (4.8, 11.3)	8.4 (5.2, 14.3)	0.061
%HOMA-IR	59 (28, 86)	68 (35, 95)	0.059

Análisis multivariante con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs9282541 <i>ABCA1</i>	9	C <u>T</u>	Hipoalfalipoproteinemia		2.0 (1.17-
			c-HDL<40mg/dL	0.011	3.42)
			Glucosa alterada en ayuno	0.013	2.11 (1.17-
			Glucosa>100mg/dL		3.83)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 9: Asociaciones genotipo-fenotipo de rs2237875 de KCNQ1**

Parámetro	CC	CT/TT	P
Triglicéridos	94 (75, 126)	104 (80, 141)	0.042

Análisis multivariante con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs2237895 <i>KCNQ1</i>	11	C <u>T</u>	Resistencia a la insulina HOMA-IR>90p	0.006	2.58 (1.32-5.06)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 10: Asociaciones genotipo-fenotipo de rs780094 de GCKR**

Parámetro	CC	CT/TT	P
AST	27 (24, 31)	29 (27, 34)	0.013

Análisis multivariante con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs780094 GCKR	2	<u>C</u> T	Resistencia a la insulina HOMA-IR>90p	0.00 1	1.02 (1.01-1.36)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 11: Asociaciones genotipo-fenotipo de rs972283 de KLF14**

Parámetro	CC	CT/TT	P
Insulina	7.1 (3.4, 11.1)	8.2 (4.3, 12.6)	0.007
HOMA-IR	1.6 (0.8, 2.7)	1.8 (1, 2.9)	0.05

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs972283 KLF14	7	T <u>C</u>	Resistencia a la insulina HOMA-IR>2.6	0.012	2.22 (1.18-4.17)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

**Tabla 12: Asociaciones genotipo-fenotipo de rs4675095 de IRS**

Parámetro	AA	AT/TT	P
pCintura	50 (31, 75)	75 (25, 90)	0.039
pIMC	48 (33, 76)	66 (35, 91)	0.026

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

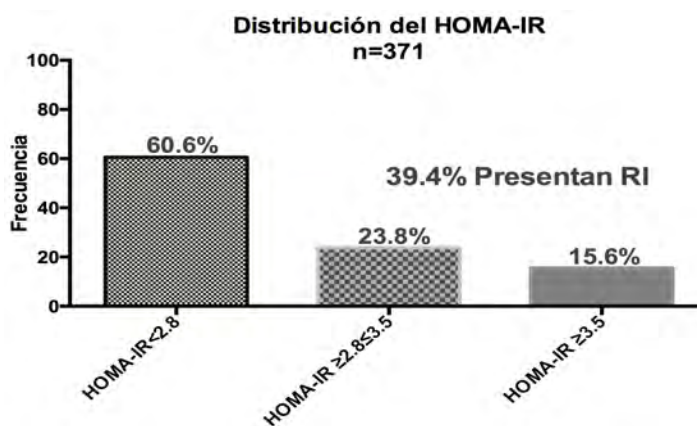
SNP/Gen	Cromosoma	Alelo	Característica	P	OR IC95%
rs467509 5 IRS1	2	A T	Obesidad central pCintura>75	0.041	1.93 (1.02-3.65)

Regresión logística multinomial con variables fijas: edad, género y pIMC. P<0.05

## Segunda etapa

### Frecuencia de RI

Para llevar a cabo la segunda etapa primero se estratificó a la población con base al HOMA-IR, esta estratificación muestra la elevada prevalencia de RI (39.4%), para esta segunda etapa se consideró a los niños que presentaron un fenotipo extremo de RI (gráfica 3).



**Gráfica 3: Frecuencia de resistencia a la insulina**

### Selección de fenotipos extremos de RI

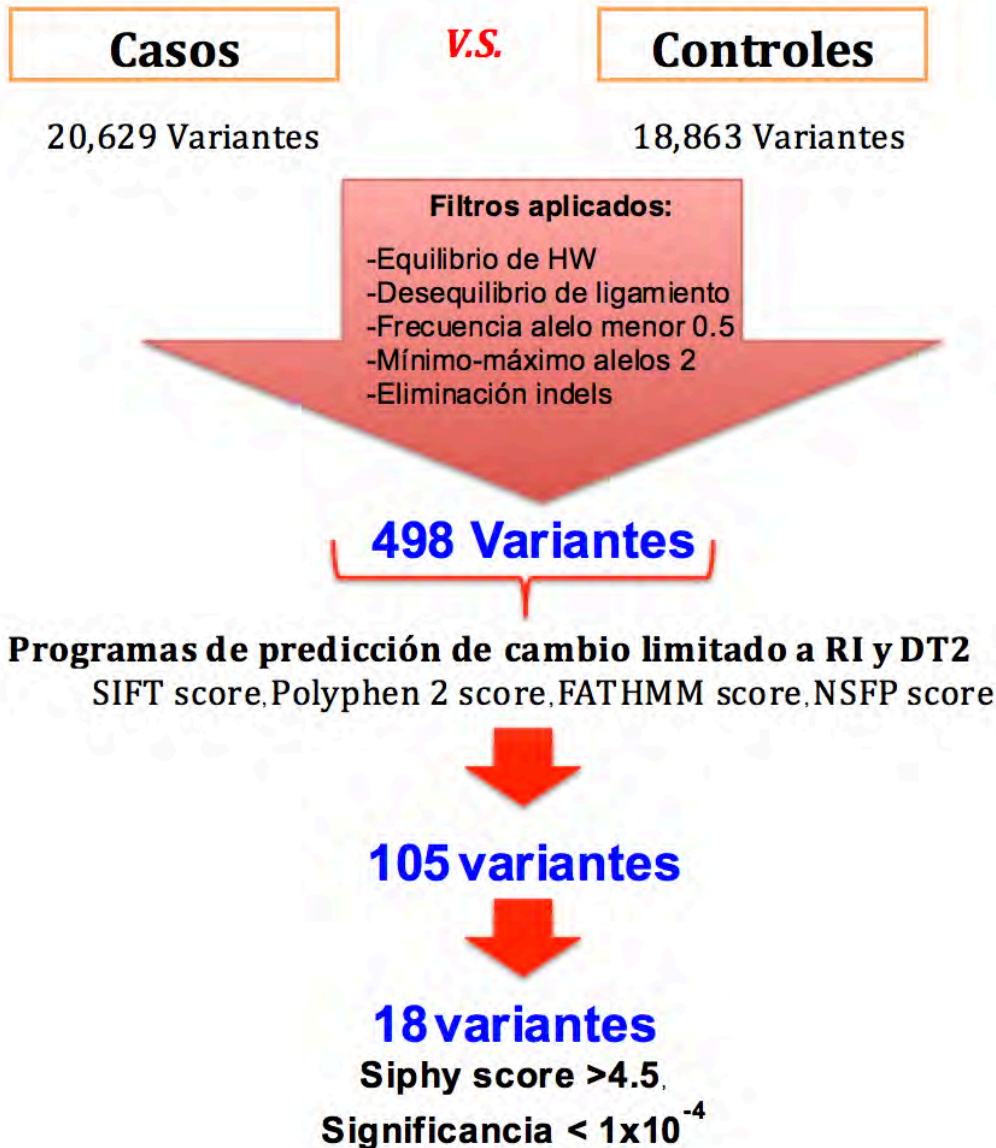
Los niños con RI fueron estratificados con base a los HOMA-IR>p90 y HOMA-IR>p95 con valores de insulina superiores al percentil 70, una vez que se identificaron estos niños se parearon considerando la edad, género y el percentil de cintura con aquellos que presentan un HOMA-IR y percentil de insulina menor al 50%, ambos grupos presentaron c-HDL>40mg/dL, triglicéridos<110mg/dL y glucosa<100mg/dL esto lo denominamos fenotipos extremos, la descripción de los grupos se muestra en el esquema 3.

<b>Caso 1:</b> pHOMA-IR 99%, pInsulina 99%	<b>Control 1:</b> pHOMA-IR 40%, pInsulina 45%
<b>Caso 2:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 2:</b> pHOMA-IR 60%, pInsulina 75%
<b>Caso 3:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 3:</b> pHOMA-IR 45%, pInsulina 25%
<b>Caso 4:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 4:</b> pHOMA-IR 65%, pInsulina 75%
<b>Caso 5:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 5:</b> pHOMA-IR 60%, pInsulina 60%
<b>Caso 6:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 99%	<b>Control 6:</b> pHOMA-IR 25%, pInsulina 10%
<b>Caso 7:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 7:</b> pHOMA-IR 55%, pInsulina 50%
<b>Caso 8:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 8:</b> pHOMA-IR 55%, pInsulina 60%
<b>Caso 9:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 99%	<b>Control 9:</b> pHOMA-IR 50%, pInsulina 50%
<b>Caso 10:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 10:</b> pHOMA-IR 10%, pInsulina 25%

**Esquema 3. Selección de casos-contrroles para la búsqueda de genes asociados a resistencia a la insulina**

## Estrategia para la identificación de variantes genéticas involucradas en la RI

Una vez secuenciados los casos y los controles, el análisis bioinformático incluyó diferentes filtros que permitieron conservar solo las variantes informativas, estas variantes debían estar asociadas con RI y DT2 con base en los programas de simulación *in silico* y sólo debían estar presentes en los casos (esquema 4).



Esquema 4. Estrategia de selección de variantes genéticas asociadas a RI en los niños Mayas

Una vez identificadas las variables genéticas asociadas a DT2 y RI se procedió a buscar en Ensembl, DisGeNet y GeneMANIA la significancia clínica y los mecanismos en los que se encuentran involucradas (Tabla 13)

**Tabla 13. Descripción de la función de las variantes genéticas encontradas**

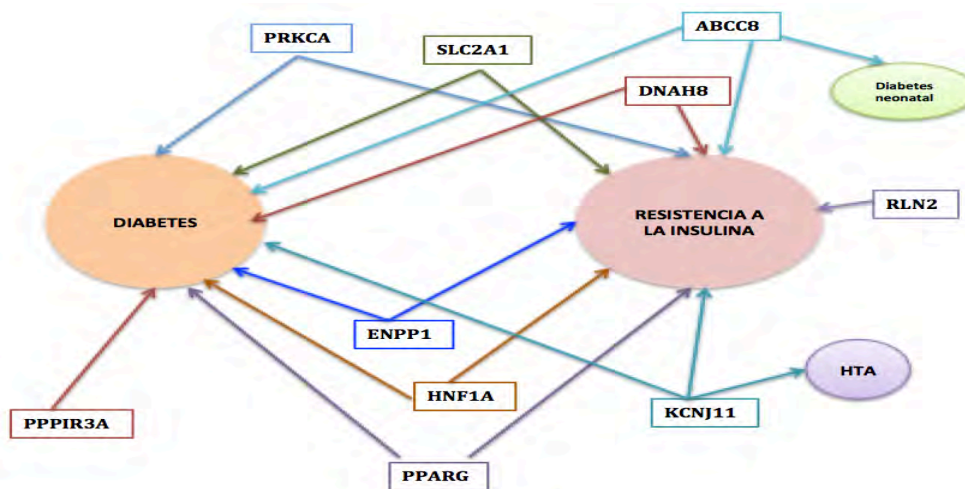
<b>Gen</b>	<b>Funciones</b>
<b>ABCC8</b>  Casete de unión a ATP, subfamilia C, miembro 8	Secreción de insulina, enlace de canales iónicos, complejo de canales iónicos, transporte de catión inorgánico monovalente, secreción de hormona peptídica , secreción de péptidos, transporte de péptidos, transporte de iones potasio, transporte de iones potasio, regulación de niveles hormonales, regulación de la secreción hormonal, regulación de la secreción de insulina, regulación de la secreción de hormona peptídica, regulación de la secreción de péptidos, regulación del transporte de péptidos , liberación de señal, complejo transportador transmembrana, complejo de canales de potasio dependiente de voltaje
<b>DNAH8</b>  Dineína axonemal 8	Adipogénesis y almacenamiento de lípidos
<b>ENPP1</b>  Ectonucleotido pirofosfatasa fosfodiesterasa 1	Control de la señalización celular en respuesta a la insulina, homeostasis de carbohidratos, transporte de carbohidratos, homeostasis de glucosa, importación de glucosa, transporte de glucosa
<b>HNF1A</b>  Factor nuclear hepático 1 alfa	Transporte de la glucosa, homeostasis de carbohidratos, transporte de carbohidratos, homeostasis de glucosa, importación de glucosa, transporte de glucosa, transporte de hexosa, secreción de hormonas, transporte de hormonas, secreción de insulina, transporte de monosacáridos, secreción de péptidos hormonales, secreción peptídica, transporte de péptidos, regulación de niveles hormonales, región reguladora Unión de DNA, unión a ácido nucleico de región reguladora, actividad de factor de transcripción de ARN polimerasa II de unión a DNA de secuencia específica, liberación de señal, iniciación de transcripción del promotor de ARN polimerasa II, unión de DNA de región reguladora de la transcripción



Gen	Funciones
<p><b>KCNJ11</b></p> <p>Miembro 11 de la subfamilia J del canal de potasio</p>	<p>Secreción de insulina, enlace de canales iónicos, complejo de canales iónicos transporte de catión inorgánico monovalente, secreción peptídica de hormona, secreción peptídica, transporte de péptido, complejo de canal de potasio, transporte transmembrana de ión potasio, transporte de iones potasio, enlace ribonucleósido purina trifosfato, regulación de niveles hormonales, regulación de la secreción hormonal, regulación de la secreción de insulina, regulación de secreción de hormona peptídica, regulación de la secreción de péptidos, regulación del transporte de péptidos, liberación de señal, complejo transportador transmembrana, complejo de canales de potasio dependiente de voltaje</p>
<p><b>PPARG</b></p> <p>Peroxisoma proliferador activado gamma</p>	<p>Homeostasis de carbohidratos, homeostasis de glucosa, unión de DNA de región reguladora, unión de ácido nucleico de región reguladora, respuesta al estímulo extracelular, respuesta a nutrientes, respuesta a niveles de nutrientes, actividad de factor de transcripción de ARN polimerasa II de unión específica de DNA, secuestro de triglicéridos, iniciación de transcripción de Promotor de la ARN polimerasa II, región reguladora de la transcripción, unión al DNA</p>
<p><b>PPP1R3A</b></p> <p>Subunidad 3 músculo específica de la fosfatasa 1</p>	<p>Metabolismo de carbohidratos, transporte de glucosa, transporte de hexosa, secreción de hormonas</p>
<p><b>PRKCA</b></p> <p>Proteína cinasa C tipo alfa</p>	<p>Secreción de insulina, secreción de hormona peptídica, secreción de péptidos, transporte de péptidos, regulación de niveles hormonales, regulación de secreción hormonal, regulación de secreción de insulina, regulación de la secreción de hormona peptídica, regulación de la secreción de péptidos, regulación del transporte de péptidos, liberación de señal</p>
<p><b>RLN2</b></p> <p>Relaxina 2</p>	<p>Secreción de la insulina</p>

Gen	Funciones
<b>SLC2A1</b> Familia 2 de transportadores de solutos, transporte facilitado de glucosa miembro 1	Transporte de carbohidratos, desarrollo de páncreas endocrino, desarrollo de sistema endocrino, derivación de energía por oxidación de compuestos orgánicos, metabolismo de reserva de energía, transporte de glucosa, transporte de hexosa, secreción de hormonas, transporte de hormonas, secreción de insulina, transporte de monosacáridos, desarrollo de páncreas, hormona peptídica secreción, secreción de péptidos, transporte de péptidos, regulación de niveles de hormonas, regulación de la secreción de hormonas, regulación de la secreción de insulina, regulación de la secreción de hormona peptídica, regulación de la secreción de péptidos, regulación del transporte de péptidos.

Una vez identificada la función y los mecanismos en los cuales se encuentran involucradas las variantes encontradas en el análisis de simulación *insilico* se diseñó un esquema para representar las posibles interacciones entre los genes de acuerdo a su asociación con la DT2, RI o ambas (esquema 5)



**Esquema 5. Genes en los que se encontraron variantes asociadas a RI y diabetes**

Las líneas indican en que patologías están involucradas las variantes encontradas (132-134).

## VII. Discusión

La RI es una condición controvertida que juega un papel importante en múltiples alteraciones metabólicas, sin embargo, la mayoría de los trabajos se centran en el desenlace ligado a RI, como es el caso de la obesidad, HTA, SM y DT2, en donde la presencia de RI es un factor clave para el desarrollo de estas patologías, claro ejemplo son los estudios de DT2. La DT2 es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles elevados de glucosa resultado de defectos en la secreción de la insulina, acción de la insulina, o ambas (135). Los investigadores centran sus estudios en evaluar variantes genéticas asociadas a DT2 las cuales hasta el momento se encuentran implicadas en la función de la célula  $\beta$ , principalmente en las vías de secreción a la insulina, sin embargo, la antesala que es dada por la RI es poco estudiada. Por otro lado, en la población infantil se estudia a la RI solo condicionada por el sobrepeso y obesidad dejando de lado las hipótesis planteadas por Reaven desde 1988 donde señala que la RI es el factor implicado en el desarrollo de las alteraciones que conforman al SM (72). Por ello, en este trabajo se estudio la RI en niños tanto en población abierta (n=371) como en los fenotipos extremos de RI (HOMA-IR<p5, HOMA-IR>p95), primero se evaluó la malnutrición en términos de frecuencia de sobrepeso/obesidad y bajo peso. Los resultados de este trabajo revelan que un 38.3% de los niños Mayas presentan sobrepeso u obesidad, dato superior a lo reportado por la ENSANUT 2016 (34.4%) (52). Si bien la tendencia a ubicarse en percentiles más altos de peso para la edad y el aumento en los valores del percentil de índice de masa corporal (pIMC>85) constituyen una señal de alerta que debe motivar a una intervención, debe considerarse que este aumento en el IMC puede estar condicionado por una alteración en el perfil dislipidémico causado por la RI que se asocia a obesidad, SM y DT2 (136), aunado a la frecuencia de bajo peso (6.7%), donde se ha demostrado que los niños con un IMC menor al percentil tres presentan un elevado riesgo a desarrollar RI a causa de las agresiones nutricionales que los lleva a sufrir intolerancia a la glucosa y DT2 en la vida adulta (137, 138). Al comparar los resultados generales de la población

estudiada con lo reportado en los niños mexicanos de características similares (Tabla 2), se observan discrepancias importantes, lo primero a señalar es que estos estudios fueron realizados en niños con obesidad a los cuales les determinaron la frecuencia de RI y dislipidemias, sin embargo, llama la atención que en el presente trabajo al evaluar una población abierta de niños indígenas de nueve años se encuentre una mayor frecuencia de RI sin estar condicionada por la presencia de obesidad (25%). Por otro lado, nuestros resultados presentan una mayor diferencia en la frecuencia de alteraciones metabólicas respecto del promedio reportado en la literatura para niños obesos, donde las comparaciones muestran: hipoalfalipoproteinemia (78.7% vs 15.1%), hipercolesterolemia (72% vs 9.1%), hipertrigliceridemia (51.2% vs 27%), obesidad central (44.2% vs 25%), PA elevada (31.3% vs 8.9%) y glucosa alterada en ayuno (15.4% vs 1.2%) (139-142). Estas alteraciones componen al SM donde la RI es el componente clave en el desarrollo del mismo por estar implicado en la regulación de la lipogénesis y lipólisis que se asocian con obesidad visceral, aumento de triglicéridos, c-VLDL y disminución de las concentraciones de c-HDL (81). La RI también juega un papel clave manteniendo la PA donde la hiperinsulinemia que es una característica de la RI provoca un incremento en la absorción de sodio renal lo que conduce a un aumento en el tono simpático dando como resultado una vasodilatación alterada (82), si bien la RI sólo ha sido relacionado a HTA en población adulta, en la población infantil debe ser considerado ya que en este trabajo uno de cada tres niños presenta alteración en la PA caracterizada por un percentil mayor a 90. En el caso de la glucosa alterada en ayuno que se presenta en menor frecuencia en comparación a las otras alteraciones metabólicas evaluadas en este trabajo, estos resultados pudiesen ser un reflejo de los estadios iniciales de RI donde se ha sugerido que la tolerancia a la glucosa es normal debido a la función compensadora de las células  $\beta$  hasta alcanzar un estado de glucotoxicidad que resulta en múltiples defectos en la célula  $\beta$  que conducen al desarrollo de DT2. Como se ha mencionado, la insulina presenta una estrecha relación con la obesidad y a su vez con otras alteraciones metabólicas como el aumento de triglicéridos, c-LDL, niveles elevados de glucosa, PA elevada y bajas

concentraciones de c-HDL, esto se hace más evidente al comparar a la población estudiada por sexo (Tabla 3), en los resultados se observa que las niñas presentan un mayor percentil de cintura además de un aumento en las concentraciones de triglicéridos, disminución de c-HDL y RI, este patrón coincide con lo reportado en la literatura en la cual se señala a la circunferencia de cintura como el mejor predictor de riesgo cardiovascular y de desórdenes metabólicos (143), sin embargo, sería importante enfatizar que estos resultados se deban a una disminución en la sensibilidad a la insulina, que si bien la evidencia señala un exceso de adiposidad, ésta se puede ver exacerbada por los cambios en las concentraciones de insulina en el desarrollo puberal (144), aunque Hirschler y cols. no encuentran diferencias significativas en las concentraciones de insulina al estratificar el desarrollo puberal por índice Tanner (145). En las niñas se encontraron concentraciones más altas de insulina con respecto a los niños que llegan a ser estadísticamente significativas. Las elevadas concentraciones de insulina han demostrado ser precedentes del desarrollo de un perfil aterogénico caracterizado por niveles bajos de c-HDL, concentraciones altas de triglicéridos y elevación en la PA (146), características que replican en este trabajo donde las niñas presentan mayores concentraciones de insulina, un HOMA-IR elevado aunado a mayores concentraciones de triglicéridos y bajas concentraciones de c-HDL y obesidad visceral. Se sabe que la tendencia fisiológica es el almacenamiento de triglicéridos en adipocitos pequeños periféricos, pero cuando la capacidad de estas células se sobrepasa, se acumulan en el músculo y causan RI en diversos tejidos (147), esta predisposición podría explicar el caso de los niños evaluados donde la hipertrigliceridemia es el denominador común. Siguiendo con la evaluación de la población, se consideró importante describir a los niños por escuela con la finalidad de evidenciar las alteraciones metabólicas constantes en todas las escuelas, se observaron alteraciones en concentraciones de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol, HOMA-IR y percentil de PA en al menos el 25% de la población escolar, estas alteraciones están ligadas directa o indirectamente con la RI (1). Al estratificar a la población por escuela se encuentran datos interesantes, llama la atención que la escuela HEZ presenta una mayor mediana

de peso y talla pero al comparar los percentiles de IMC la escuela LAE presenta los mayores percentiles dado que los niños tienen menor altura, estos resultados revelan una malnutrición caracterizada por una talla baja para edad que coincide con otros estudios donde aumenta la intolerancia a la glucosa, lo que conlleva a RI desembocando en mayores concentraciones de triglicéridos, colesterol y bajas concentraciones de c-HDL (148). La escuela HEZ presenta una correlación entre las concentraciones elevadas de insulina, los niveles de HOMA-IR y el percentil de cintura, reflejo de la disminución de la sensibilidad a la insulina (149), además, esta escuela presenta mayores percentiles de PA que pueden estar relacionados con la RI, la cual ha sido asociada con la inhibición de péptidos natriuréticos cardíacos lo que ocasiona una hiperactividad sostenida del sistema renina-angiotensina-aldosterona que desencadena en PA elevada (150). La diferencia entre las escuelas sugiere que aún en comunidades muy cercanas existen variantes en el medio ambiente y en su genética que deben ser estudiadas a más profundidad, así mismo, llama la atención el gran número de alteraciones presentes en los niños Mayas de comunidades rurales, en las que se esperaría un mejor estado de salud dado el bajo estrés, medio ambiente poco contaminado aunado al poco o nulo uso de las tecnologías informáticas. Esto hace evidente la necesidad de estudiar los componentes genéticos involucrados en el desarrollo de la RI y otras patologías a edades tempranas. Con la finalidad de revelar la existencia de un fondo genético común involucrado en el desarrollo de RI en la población Maya con respecto a otras poblaciones se compararon la frecuencia de los polimorfismos seleccionados con respecto a los resultados del proyecto 1000 genomas encontrando algunas diferencias significativas. Dentro de los polimorfismos genéticos evaluados los más replicados son *TCF7L2* y *ABCA1*, ambos mostraron resultados muy interesantes y explican en parte la condición de RI en la población indígena infantil. En el caso de *TCF7L2*, la frecuencia del alelo de riesgo se encuentra un 20% más alta en las poblaciones europeas y africanas en comparación con la población asiática y la nativa americana, de manera particular la población Maya presenta la frecuencia más baja del alelo de riesgo tanto en la población adulta (9%) como en la población infantil (8.5%) al

compararla con los estudios realizados en población mestiza mexicana (17.8%) (6). Este polimorfismo es uno de los más estudiados en el mundo y de manera particular en la población mexicana, esta variante ha sido asociada con alteraciones en la secreción de insulina y diabetes de inicio temprano (101, 151). Los estudios en población adulta mexicana muestran un riesgo de 3.5 mayor de desarrollar DT2 en los portadores de la variante de riesgo (152), estos hallazgos no han replicado en la población adulta Maya (102), sin embargo, en el presente estudio se encontró una fuerte asociación con hipertrigliceridemia a pesar de ajustar los datos por IMC. Estos resultados sugieren que los niños Mayas tienen un fondo genético que los conduce a RI sin pasar por obesidad, lo que nos lleva a especular que la presencia de hipertrigliceridemia (factor común en los niños Mayas) ante otro condicionante como el sobrepeso y/obesidad conlleve al desarrollo de RI y algunos de los componentes que la acompañan. Esta es la primera vez que se asocia la variante rs7903146 de *TCF7L2* con triglicéridos elevados en niños. Otro de los genes más estudiados en la población mestiza mexicana es el *ABCA1*, la frecuencia de su alelo de riesgo es exclusivo de la población nativa-americana (4.1%), la frecuencia del alelo de riesgo en la población mexicana alcanza hasta un 28% (123), estudios realizados en niños mexicanos revelan una frecuencia del 11.9% mientras que en este trabajo la frecuencia alcanza un 18%. Los estudios realizados en la población mexicana señalan a la variante rs9282541 de *ABCA1* se asocia en adultos con bajas concentraciones de c-HDL y DT2 (102, 153)., en los niños ha sido asociada con mayor IMC, %grasa, concentraciones elevadas de triglicéridos y bajas concentraciones de c-HDL (140, 141), en este trabajo la variante mostró asociación con hipoalfalipoproteinemia y glucosa alterada en ayuno, aunado a que los portadores de uno o dos alelos de riesgo presentan mayores concentraciones de insulina y el HOMA-IR, estos hallazgos son interesantes, por una parte sugieren que la variante de *ABCA1* está implicada en el desarrollo de RI en los niños Mayas, lo cual puede deberse a alteraciones en la secreción de insulina ocasionadas principalmente por una interrupción en la fusión de los gránulos de insulina con la membrana de la célula  $\beta$  (154, 155), aunque los niveles

intracelulares de colesterol también pueden influenciar la función de las células  $\beta$  pancreáticas, donde la acumulación de colesterol intracelular conduce a una marcada reducción en la secreción de insulina y un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa que conlleva al desarrollo de RI y DT2 (102, 156). Por otro lado, al evaluar la frecuencia del alelo de riesgo de la variante *CDKN2A/2B* se encontraron diferencias con respecto a la población africana y asiática, sin embargo, las frecuencias encontradas en la población infantil (86.6%) son similares a las encontradas en la población adulta Maya (88.5%), con respecto al estudio de asociación, la variante rs10965250 de *CDKN2A/2B* presenta asociación con glucosa alterada en ayuno (glucosa >100mg/dL), los portadores del alelo de riesgo tienen una probabilidad 1.4 veces mayor de presentar esta alteración, además la presencia de uno o dos alelos de riesgo de este gen están asociados con mayores concentraciones de colesterol y c-LDL. Este polimorfismo se asocia al desarrollo de DT2. En el caso de la población mexicana sólo dos estudios han replicado esta asociación, uno de ellos encontró que la variante *CDKN2A/2B* confiere un riesgo mayor en 1.4 veces para el desarrollo de DT2 en la población mestiza mexicana (101), el otro estudio encuentra la variante rs10965250 de *CDKN2A/2B* asociada con un riesgo mayor (OR= 2.01, P=0.047) para el desarrollo de DT2 en la población indígena Maya (102). Los resultados sugieren que si bien este polimorfismo hasta el momento no muestra una asociación directa con RI, la asociación encontrada con la glucosa alterada en ayuno aunado al papel del polimorfismo en el desarrollo de DT2 en la población adulta Maya revela que este polimorfismo es de riesgo para el desarrollo de DT2, estos resultados serán exacerbados con una mayor exposición con los factores ambientales (98, 100, 102). Otro de los polimorfismos clave en la RI es el *IRS-1*, este gen juega un papel importante en la señalización de la insulina. Llama la atención que esta variante se presenta en mayor frecuencia en la población Maya duplicando la frecuencia reportada para la población nativo-americana y la asiática. Los estudios realizados en Mexicanos evidencian una fuerte asociación del polimorfismo rs4675095 de *IRS-1* con DT2 por su papel en la cascada de señalización de la insulina y el control del transporte de glucosa estimulado por la insulina, este polimorfismo se ha



descrito entre el 10 y 20% de los pacientes con DT2 en diferentes poblaciones incluida la población mexicana, llama la atención que a pesar de la elevada frecuencia del alelo de riesgo en los niños Mayas no se encontró asociación con la RI, sin embargo, esta variante mostró una asociación con obesidad central (OR= 1.93 P=0.04) aunado a la presencia de una correlación positiva entre el alelo de riesgo y un mayor pIMC, los resultados publicados por el consorcio MAGIC revelan una fuerte asociación de esta variante con HOMA-IR (90), considerando que la obesidad central es una medida directa de obesidad visceral la cual se asocia con una alteración en la secreción de insulina, se podría inferir que este polimorfismo está asociado de manera indirecta con RI, planteando la hipótesis de que se trata de un polimorfismo tiempo-dependiente, sugiriendo que la asociación con RI se verá reflejada con el aumento de exposición a factores ambientales (10, 157-159). Por otro lado, se evaluó al gen de *KCNQ1*, el alelo de riesgo de este gen se presenta en mayor frecuencia al compararlo con los resultados del proyecto 1000 genomas (48.4%) incluso al compararlo con la población mexicana (26%), este gen desempeña un papel clave en el potencial de la repolarización de la acción cardíaca, así como en el transporte de agua y sal en los tejidos epiteliales, este gen se expresa en los islotes pancreáticos, donde modula el potencial de membrana de las células pancreáticas. Algunas variantes de *KCNQ1* han sido asociadas con DT2, diabetes gestacional, secreción de insulina, alteración de la glucosa en ayuno, susceptibilidad a nefropatía diabética y eficacia de los fármacos contra la diabetes, en múltiples poblaciones humanas, debido a que en el páncreas las variantes de *KCNQ1* aumentan la secreción de insulina en células  $\beta$  lo que sugiere una asociación entre el gen de *KCNQ1* y la disfunción pancreática humana (160-162). Estudios realizados en mexicanos encuentran a la variante *KCNQ1* asociada con diabetes gestacional, otro trabajo revela la asociación de la variante de *KCNQ1* con DT2 después del ajuste por ancestría (101, 115). En este trabajo se encontró una asociación del polimorfismo rs2237895 de *KCNQ1* con RI (OR=2.58, P=0.006) lo que sugiere que esta variante aumenta la susceptibilidad a desarrollar DT2 a edades tempranas en la población infantil Maya. Otro de los genes poco estudiados en la población mexicana es el

*GCKR*, la frecuencia del alelo de riesgo en esta población es mayor a lo reportado en la población mexicana (34%). *GCKR* tiene un papel importante en la regulación de secreción de la insulina y el metabolismo glicogénico, es considerado un gen de susceptibilidad a DT2 por su asociación con niveles elevados de glucosa y triglicéridos (115), un estudio reciente en población mexicana asoció el polimorfismo rs780094 de *GCKR* con niveles de ALT y AST > 40U/L en adultos obesos y/o sobrepeso, encontrándolo como factor de riesgo para el desarrollo de hígado graso no alcohólico, en este trabajo se encontraron resultados interesantes, por un lado el estudio de asociación revela después de ajustar por IMC que los niños con la variante presentan mayores concentraciones de AST, estos datos son relevantes por tratarse de niños que no presentan obesidad y que se encuentran en un medio ambiente restringido, aunado a estos resultados también se encontró asociación con RI dada por un HOMA-IR mayor al percentil 90, lo que sugiere que este polimorfismo podría estar involucrado tanto en el desarrollo de DT2 como en el hígado graso no alcohólico dos de las patologías que se presentan con mayor frecuencia en la población adulta maya mestiza. Por último, se evaluó al gen *KLF14* que juega un papel crucial en la regulación del metabolismo de lípidos, la frecuencia del alelo de riesgo se encuentra en proporciones similares con respecto a la población China (46%), los meta-análisis lo han asociado a RI, obesidad y DT2 dependiente de la obesidad (113), este polimorfismo ha sido señalado como un marcador de RI y predictor de obesidad y las comorbilidades asociadas (163), sin embargo, las asociaciones no replican en todas las poblaciones (164), como es el caso de la población mexicana, en este trabajo se encontraron hallazgos interesantes, los resultados indican una asociación de la variante de riesgo con RI independiente de la edad, sexo e IMC, este sería el primer trabajo en la población mexicana que encuentra la variante rs972283 de *KLF14* asociada a RI.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el componente genético juega un papel clave principalmente en la RI, glucosa alterada en ayuno e hipertrigliceridemia es necesario evaluar variantes propias de la población

indígena mexicana que contribuyan a explicar el efecto de los polimorfismos genéticos en la RI.

Una vez evaluadas las variantes previamente reportadas, se procedió a evaluar la segunda etapa, primero se disminuyó el efecto de la obesidad y de las alteraciones metabólicas asociadas al SM para evidenciar las variantes genéticas asociadas a la RI, se planteó la evaluación del exoma completo de fenotipos extremos de RI, el uso de estos fenotipos extremos pareados por edad, sexo y comunidad con el objetivo de aumentar el poder de búsqueda de variantes genéticas de riesgo en el desarrollo de RI, pocos trabajos han empleado el uso de fenotipos extremos en enfermedades complejas los cuales han servido para revelar variantes protectoras y de riesgo para la alteración estudiada (165), hasta el momento no hay trabajos enfocados en el estudio de RI a través de la secuenciación del exoma de fenotipos extremos en niños indígenas. Con la finalidad de revelar la contribución de los factores genéticos asociados a la RI y disminuir las variantes confusoras relacionadas con los componentes del SM se descartaron los niños con obesidad central ( $p_{\text{Cintura}} > 75$ ), glucosa alterada en ayuno ( $\text{glucosa} > 100\text{mg/dL}$ ), hipertrigliceridemia ( $\text{triglicéridos} > 100\text{mg/dL}$ ) y hipoalfalipoproteinemia ( $\text{c-HDL} < 50\text{mg/dL}$ ), la aplicación de estos filtros se basa en que cuando muchos individuos no relacionados están afectados con la misma alteración ( $\text{RI} > 38.4\%$ ) se deben utilizar estrategias de superposición para simplificar el análisis de variantes comunes que puedan afectar la función del gen pero que no sean informativas para la patología estudiada (166). Además de los filtros en la selección de la población de estudio se emplearon estrategias bioinformáticas que centraron el trabajo en polimorfismos involucrados en el desarrollo de RI y DT2. El uso de estas herramientas aumenta la probabilidad de distinguir mutaciones patógenas de un gran número de variaciones de fondo, debido a que todos los programas presentan variaciones en cuanto a la especificidad y precisión es necesario emplear más de un programa antes de validar las posibles nuevas variantes (167), lo anterior aunado a la selección de los casos y controles le dan a este trabajo originalidad además de ser el primero realizado en población infantil, específicamente población Maya. Con ayuda de los

análisis de predicción se encontraron 16 variantes genéticas asociadas a RI algunas de ellas a su vez con DT2 y diabetes gestacional en 10 genes. Los genes de las variantes encontradas están involucradas en el transporte de glucosa, control de los canales de potasio sensibles a ATP, regulan la diferenciación de adipocitos, controlan la señalización celular en respuesta a la insulina, están implicados en el metabolismo de lípidos. Finalmente, gracias a las diferentes estrategias bioinformáticas se espera que cuando se validen las variantes se encuentre una fuerte asociación con RI.

Este trabajo comprendió una evaluación completa de los niños indígenas Mayas desde la evaluación de parámetros somatométricos, bioquímicos y hormonales hasta la evaluación de polimorfismos genéticos conocidos y nuevos involucrados en el desarrollo de RI, con la finalidad de sentar las bases en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, blancos terapéuticos y medidas preventivas a corto y largo plazo en beneficio de una población vulnerable como los niños Mayas.

Los resultados encontrados hasta el momento demuestran que la población Maya tiene una mayor frecuencia de RI. Los resultados muestran que la RI está condicionada por la presencia de polimorfismos asociados previamente a DT2 y RI en otras poblaciones, además de la presencia de polimorfismos propios asociados a RI y DT2, aunque aun falta validar los polimorfismos encontrados se abre una gama de posibilidades de estudio del exoma que permitan entender la contribución genética de la RI en los niños Mayas.

### III. Conclusión

- La población indígena Maya presenta una alta frecuencia de RI en comparación con otros estudios .
- Se encontró evidencia objetiva de la asociación de las variantes de los genes *KCNQ1*, *GCKR*, *KLF14* con RI, además de la asociación de *ABCA1* y *CDKNA2A/2B* con glucosa alterada en ayuno.
- Los polimorfismos de las variantes comunes están implicadas en el desarrollo de la RI y con las alteraciones metabólicas ligadas a esta condición.
- Se encontraron 16 variantes que son candidatas de susceptibilidad al desarrollo de RI en los niños Mayas.
- El análisis de exoma en población infantil Maya de México sienta las bases para la búsqueda de variantes propias asociadas a enfermedades multifactoriales.
- Es necesario hacer una exploración adicional en el exoma que extienda la búsqueda a variantes de número de copias, inserciones/deleciones que permitan encontrar otras variantes en la población Maya asociadas a la RI.

## **IX. Anexos**

### **IX.1 Datos generales y somatométricos**

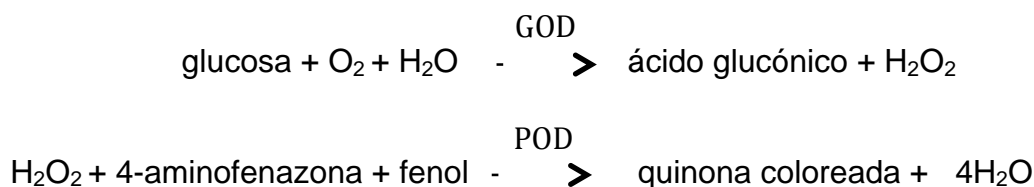
A cada participante se les midió la cintura y cadera, se registró el peso y la talla para el cálculo del índice de masa corporal (IMC) de acuerdo a las normas antropométricas internacionales. Así, la medición de la cintura se llevó a cabo con el niño de pie colocando la cinta métrica entre la costilla inferior y la cresta ilíaca después de una exhalación normal. Para el registro de la talla, se colocó al niño debajo del estadímetro de espalda a la pared con la mirada al frente, sobre una línea imaginaria vertical que dividió su cuerpo en dos hemisferios. La cabeza, espalda, pantorrillas, talones y glúteos estuvieron en contacto con la pared y sus brazos cayeron naturalmente a lo largo del cuerpo. Se trazó una línea imaginaria (Plano de Frankfort) que fue del orificio del oído a la base de la órbita del ojo. Esta línea fue paralela a la base del estadímetro y formó un ángulo recto con respecto a la pared. Cuando la marca del estadímetro estuvo entre un centímetro y otro, se anotó el más próximo; cuando quedó a la mitad, se tomó el del centímetro anterior. Se bajó el estadímetro y se tomó la lectura en centímetros. Para el registro del peso, la medición se llevó a cabo con la menor ropa posible y sin zapatos. Se pidió al niño que subiera a la báscula colocando los pies paralelos en el centro, de frente al examinador. Debía estar erguido, con la vista al frente, sin moverse y con los brazos cayendo naturalmente a los lados. Se empleó una báscula de piso, la lectura se registró cuando el indicador de la báscula se encuentre completamente fijo. La PA se evaluó mediante baumanómetros digitales infantiles con un reposo previo del niño de al menos 10 minutos y se tomó por duplicado.

### **IX.2 Determinaciones bioquímicas**

#### **IX.2.1 Glucosa**

La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrogeno formado, reacciona bajo la influencia de la peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminofenazona para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

El esquema de la reacción es la siguiente:



**Valores de referencia:** Suero o plasma sanguíneo: 70-100 mg/dL

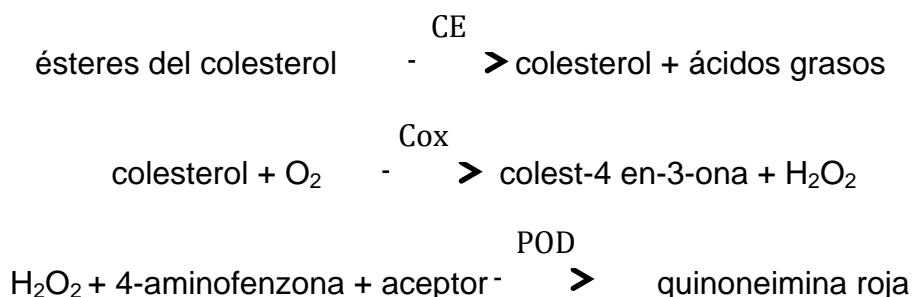
### IX.2.2 Colesterol

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada y su concentración varía en un gran número de condiciones clínicas. El colesterol es uno de los factores contribuyentes al desarrollo de aterosclerosis.

#### Fundamento

La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. Este colesterol libre se oxida en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colest-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinoneimina, con absorción máxima de 500 nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.

El esquema de la reacción es la siguiente:



**Valores de referencia:** Suero < 100 mg/dL

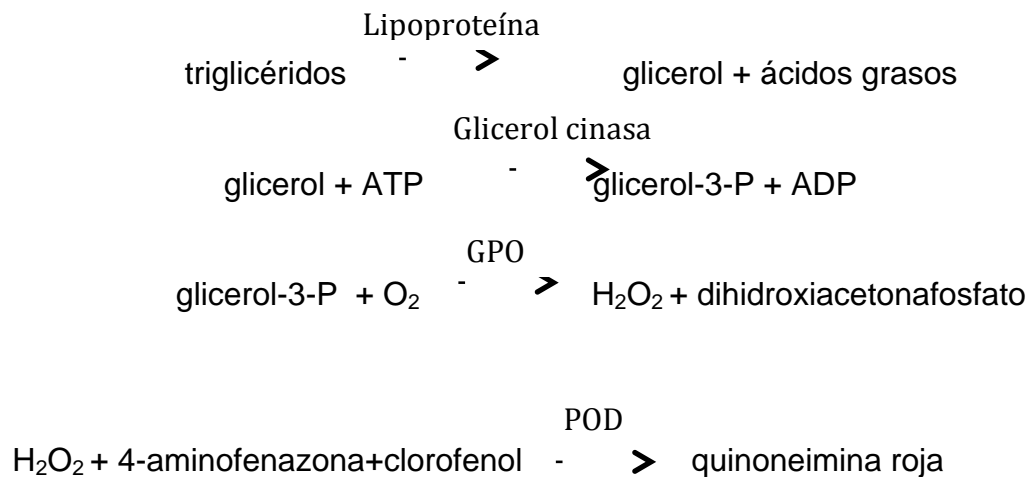
### IX.2.3 Triglicéridos

Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias, que pueden ser de origen genético o secundario a algunos tipos de patologías como la DT2.

#### Fundamento

El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos. El glicerol se fosforila por el adenosin-5-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa. La G-3-P es oxidada por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetonafosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.

El esquema de la reacción es la siguiente:



**Valores de referencia:** Suero < 100 mg/dL en niños.

### IX.2.4 c-HDL

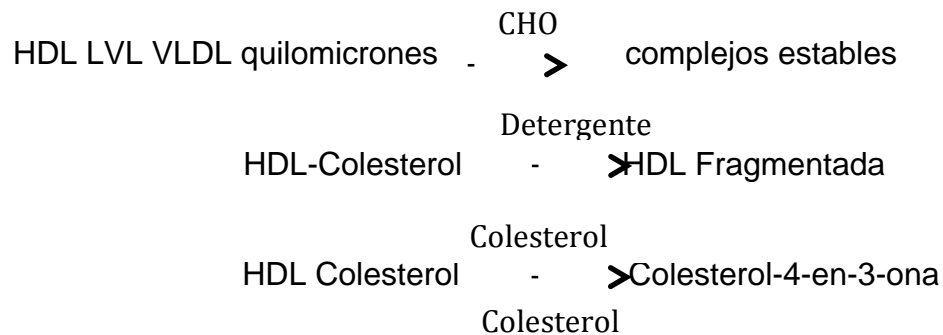
Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y provee las bases sobre la cual establecer la clasificación.



## Fundamento

En la primera etapa de la reacción, se solubiliza y consume el colesterol libre o unido a proteínas distintas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en una reacción que involucra a colesterol oxidasa (CHO) dando lugar a un complejo estable no coloreado. En una segunda etapa, las HDL son selectivamente fragmentadas por un detergente. El c-HDL es liberado para reaccionar con colesterol esterasa y colesterol oxidasa, dando un producto coloreado.

El esquema de la reacción es el siguiente:



**Valores de referencia:** Suero < 50 mg/dL en niños.

### IX.2.5 c-LDL

La lipoproteína de baja densidad (c-LDL) se puede medir directamente, aunque normalmente se reporta mediante el cálculo de una fórmula llamada “*Friedwald*”, pero ésta no tiene validez cuando los triglicéridos superan los 400 mg/dL. La fórmula es:

$$\text{c-LDL} = (\text{Colesterol}_{\text{Total}}) - (\text{c-HDL}) - (\text{Tg}/5)$$

**Valores de referencia:** Suero < 100 mg/dL en niños.

### IX.2.6 Insulinas

La concentración de insulina fue evaluada por electroquimioluminiscencia (EQL). El ensayo de insulina Elecsys emplea dos anticuerpos monoclonales que en conjunto son específicos para insulina humana.

Primera incubación: insulina presente en 20 µl de la muestra, un anticuerpo de insulina específico monoclonal biotinilado, y un anticuerpo de insulina específico

monoclonal marcado con un complejo de rutenio (Tris (2,2'-bipiridilo)-rutenio (II), complejo- (Ru(bpy))) forman un complejo tipo sándwich

Segunda incubación: Después de la adición de micropartículas recubiertas con estreptavidina, el complejo se une a la fase sólida a través de la interacción de biotina y estreptavidina.

La mezcla de reacción se aspira en la celda de medición, donde las micropartículas son capturadas magnéticamente sobre la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. La aplicación de un voltaje al electrodo entonces induce emisión quimioluminiscente que se mide por un fotomultiplicador. La cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración que es instrumento en concreto generado por calibración de 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo

**Valores de referencia:** Suero < 25  $\mu$ U/mL en niños.

### **IX.3 Determinaciones moleculares**

#### **IX.3.1 Extracción de DNA**

1. Colocar en un tubo de 15 ml, 2.5 ml de sangre (EDTA) agregar 6.25 ml de una solución Sacarosa-tritón 2X frío, llevar a un volumen final de 12.5 ml con agua desionizada estéril, mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo por 10 min (mezclar de vez en cuando suavemente).
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min a 4 C.
3. Decantar el sobrenadante y desechar.
4. Lavar el botón con 2 ml de solución de sacarosa 1X (frío).
5. Centrifugar a 2000 rpm por 15 min a 4 C.
6. Tirar el sobrenadante (con gasa limpiar la boca del tubo), el pellet debe verse color rosado, sino, lavar nuevamente con sacarosa Tritón 1X.
7. Agregar 0.8 ml de buffer de lisis nuclear al pellet y re-suspender con pipeta pasteur.
8. Agregar 55  $\mu$ l de SDS al 10% y mezclar suavemente.

9. Agregar 25  $\mu$ l de proteinasa K (5 mg/ml) e incubar a 37 C con agitación suave toda la noche.

Pasada la incubación:

10. Agregar 600  $\mu$ l de cloruro de sodio saturado y agitar vigorosamente.

11. Centrifugar a 2000 rpm por 15 min a 4 C.

12. Transferir el sobrenadante a otro tubo cónico estéril.

13. Agregar 2 volúmenes de etanol al 100% frío.

14. Mezclar suavemente por inversión y sacar el DNA con una pipeta Pasteur sellada de la punta.

15. Lavar el DNA con etanol al 70% dentro de un tubo eppendorf.

16. Dejar secar y depositar en 200  $\mu$ l de buffer TE dejando la pipeta en el tubo eppendorf por 20 min a 37 C.

17. Cuantificar DNA (lectura de 280/260 entre 1.7-2.0)

Asimismo, se realizó una dilución de cada uno de los DNA (20 ng/ $\mu$ L) que se mantuvo a -20 °C hasta que se realizó la genotipificación.

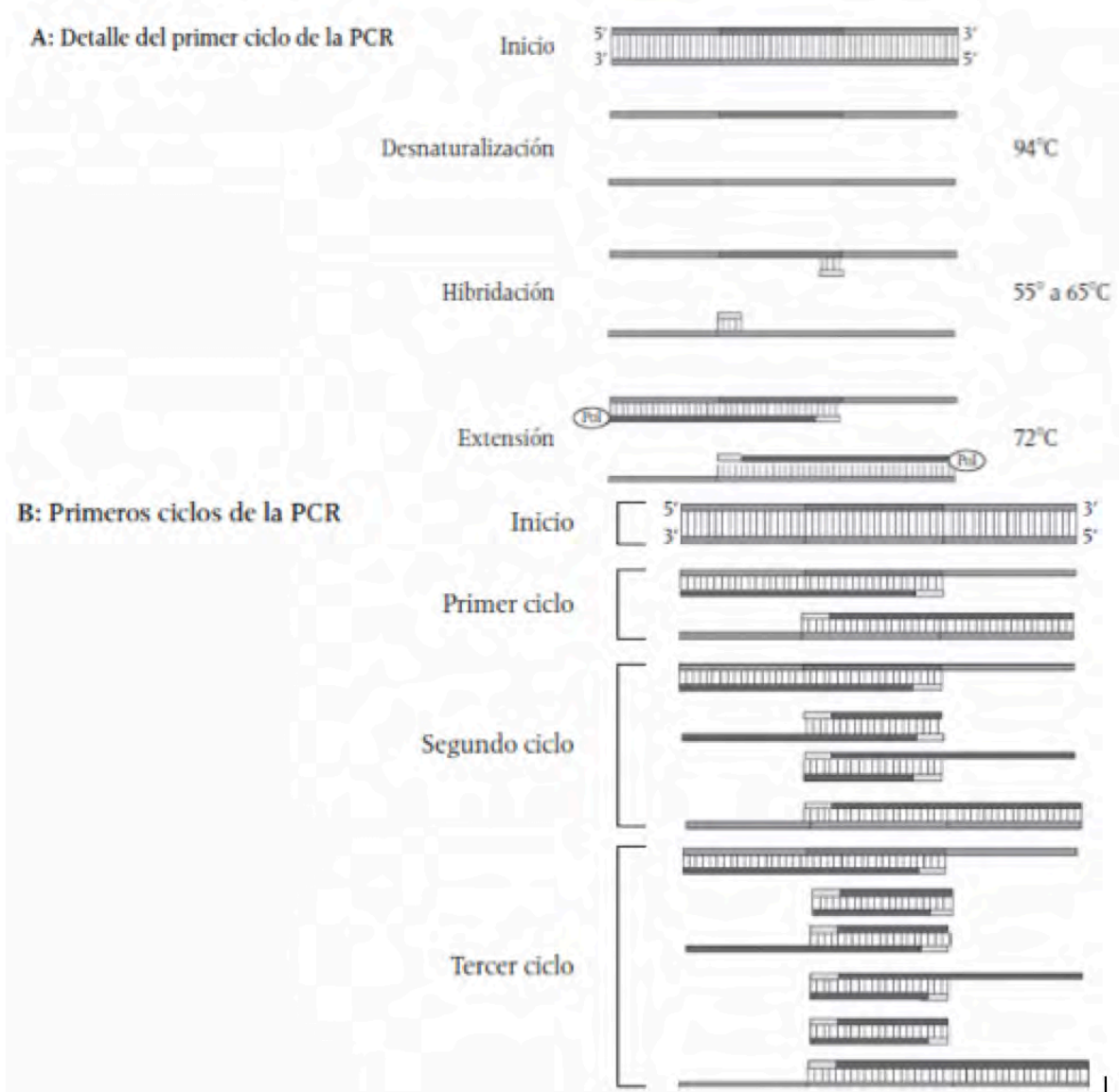
#### **IX.3.1.1 Integridad del DNA**

La integridad de DNA se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1.5 % a 90 V por 90 min en tampón 1X de buffer TBE. Un control negativo se utilizó para determinar una posible contaminación de las muestras amplificadas. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ L). La concentración de DNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC) con una absorbencia de 260/280 nm. Se realizarón diluciones de las muestras de DNA (20ng/uL).

#### **IX.3.2 PCR**

El objetivo de la PCR es obtener un gran número de copias del fragmento de DNA que contiene la variación genética buscada mediante la repetición de 30 a 35 ciclos consistentes en tres pasos (desnaturalización a 94°C, hibridación a 52°C a 65°C y extensión a 72°C) y que tienen lugar en un termociclador (Lorenz y cols. 2002; Tefferi y cols., 2002) (esquema 6). Tras la aplicación de la PCR, se

genera una suficiente cantidad de copias de la secuencia deseada (producto de PCR) para poder continuar con diferentes sistemas de detección.

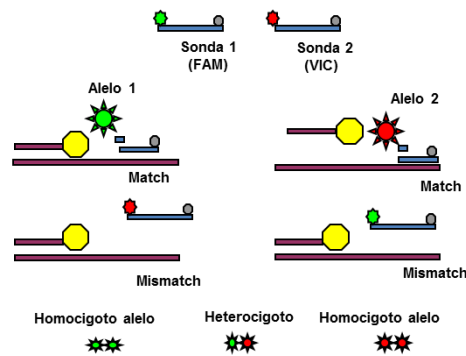


Esquema 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La discriminación alélica es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. Los SNPs son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica de dos individuos. Se trata de la variación genética más abundante en los genomas. Como media en el Genoma Humano hablamos de una variación en cada 500-1000 pares de bases. Esta variación se considera polimorfismo cuando la variación afecta a más del 1% de la población.

Para los ensayos de discriminación alélica se emplean sondas específicas marcadas con fluorocromos. Un donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos los ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman los fluorocromos empleados son VIC y FAM.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador, como donador y aceptor están, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector. (esquema 7)



**Esquema 7. Mecanismo de la PCR con sondas Taqman**

El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos.

### IX.3.2 Preparación Sacarosa-Tritón 2X

Reactivos		Modo de Preparación
219 g	Sacarosa	Pesar los reactivos y colocar en un matraz de aforo, aforar a un litro con agua des-ionizada, ajustar el pH a 7.6, filtrar y almacenar a 4°C.
2.42 g	Tris base	
2.03 g	MgCl <sub>2</sub>	
10 mL	Tritón 100X	

### IX.3.3 Preparación de Proteínasa K (5mg/mL)

Reactivos		Modo de Preparación
50 mg	Proteinasa K (Fungal, cat.25530-015, Invitrogen)	Pesar la proteinasa K y aforar a 10mL, mezclar completamente, hacer alícuotas de 500µL, almacenarlas a -20°C.

### IX.3.4 Preparación de Buffer de lisis-nuclear

Reactivos		Modo de Preparación
1.21 g	Tris-Base	Pesar los reactivos y colocar en un matraz de aforo, aforar a 500mL, esterilizar a 110°C (15lb/in <sup>2</sup> ) durante 15 min. Almacenar a temperatura ambiente
23.4 g	NaCl	
0.75 g	Na <sub>2</sub> EDTA	

### IX.3.5 Preparación de Cloruro de Sodio saturado

Reactivos		Modo de Preparación
350 g	NaCl	Disolver 350g de NaCl en un litro de agua destilada, solubilizar lo más posible (queda una capa en el fondo), se almacena a temperatura ambiente.

### IX.3.6 Gel de Agarosa al 1.5%

Reactivos		Modo de Preparación
0.9 g	Agarosa	Colocar en un matraz Erlenmeyer, meter en microondas hasta disolver muy bien (prox.45 seg), esperar a que se enfríe un poco y posteriormente adicionar 1µL de Bromuro de etidio, mezclar perfectamente y vaciar de inmediato en la placa.
60 mL	TBE 1X	

### IX.3.8 Buffer TBE 10X

Reactivos		Modo de Preparación
108 g	Tris base	Colocar los reactivos en un matraz de aforo. Aforar a 1000 mL con agua destilada estéril y filtrar con vacío, almacenar a temperatura ambiente.
55 g	Ácido Bórico	
40 mL	EDTA 0.5M pH 8.0	

### IX.3.9 Buffer de carga para DNA

Reactivos		Modo de Preparación
25 mg	Azul de bromofenol 0.25%	Disolver los reactivos pesados en 10 ml de agua destilada estéril, mezclar perfectamente y realizar alícuotas de 1mL.
25 mg	Cianol-xileno 0.25%	
1.5 g	Ficoll PM 400 al 15%	

### IX.4 Selección de casos y controles

Selección de casos y controles, se seleccionaron a los niños que presentaban como características principales c-HDL >40mg/dL, triglicéridos < 110mg/dL y glucosa < 100mg/dL además de cumplir con las características que se describe a continuación:

<b>Caso 1:</b> pHOMA-IR 99%, pInsulina 99%	<b>Control 1:</b> pHOMA-IR 40%, pInsulina 45%
<b>Caso 2:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 2:</b> pHOMA-IR 60%, pInsulina 75%
<b>Caso 3:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 3:</b> pHOMA-IR 45%, pInsulina 25%
<b>Caso 4:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 4:</b> pHOMA-IR 65%, pInsulina 75%
<b>Caso 5:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 5:</b> pHOMA-IR 60%, pInsulina 60%
<b>Caso 6:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 99%	<b>Control 6:</b> pHOMA-IR 25%, pInsulina 10%
<b>Caso 7:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 95%	<b>Control 7:</b> pHOMA-IR 55%, pInsulina 50%
<b>Caso 8:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 8:</b> pHOMA-IR 55%, pInsulina 60%
<b>Caso 9:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 99%	<b>Control 9:</b> pHOMA-IR 50%, pInsulina 50%
<b>Caso 10:</b> pHOMA-IR 95%, pInsulina 90%	<b>Control 10:</b> pHOMA-IR 10%, pInsulina 25%



## X. Referencias

1. Ros Perez M, Medina-Gomez G. [Obesity, adipogenesis and insulin resistance]. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7):360-9.
2. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 1998;105(4):331-45.
3. Matsuda M. Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(2):79-86.
4. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med.* 1997;50(5):191-7.
5. Ferrannini E, DeFronzo RA. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Eur Heart J.* 2015;36(34):2288-96.
6. Garcia-Chapa EG, Leal-Ugarte E, Peralta-Leal V, Duran-Gonzalez J, Meza-Espinoza JP. Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3937893.
7. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 1998;182(1-2):31-48.
8. Parker VE, Savage DB, O'Rahilly S, Semple RK. Mechanistic insights into insulin resistance in the genetic era. *Diabet Med.* 2011;28(12):1476-86.
9. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
10. Guo S. Molecular Basis of Insulin Resistance: The Role of IRS and Foxo1 in the Control of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2013;10(1-2):e27-e33.
11. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 2003;302(5651):1710-1.
12. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell.* 2012;150(6):1223-34.
13. Mathai S, Cutfield WS, Derraik JG, Dalziel SR, Harding JE, Robinson E, et al. Insulin sensitivity and beta-cell function in adults born preterm and their children. *Diabetes.* 2012;61(10):2479-83.
14. Ighbariya A, Weiss R. Insulin Resistance, Prediabetes, Metabolic Syndrome: What Should Every Pediatrician Know? *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9(Suppl 2):49-57.
15. Gungor N, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Validation of surrogate estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescents. *J Pediatr.* 2004;144(1):47-55.
16. Gutierrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):214-28.
17. Eyzaguirre F, Mericq V. Insulin resistance markers in children. *Horm Res.* 2009;71(2):65-74.
18. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* 2005;2005(268):pe4.
19. Andreozzi F, Procopio C, Greco A, Mannino GC, Miele C, Raciti GA, et al. Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. *Diabetologia.* 2011;54(7):1879-87.

20. Boucher J, Charalambous M, Zarse K, Mori MA, Kleinridders A, Ristow M, et al. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors are required for normal expression of imprinted genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):14512-7.
21. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
22. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E581-91.
23. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*. 2000;6(8):924-8.
24. Dash S, Sano H, Rochford JJ, Semple RK, Yeo G, Hyden CS, et al. A truncation mutation in TBC1D4 in a family with acanthosis nigricans and postprandial hyperinsulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9350-5.
25. Hribal ML, Tornei F, Pujol A, Menghini R, Barcaroli D, Lauro D, et al. Transgenic mice overexpressing human G972R IRS-1 show impaired insulin action and insulin secretion. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):2096-106.
26. Pandini G, Pace V, Copani A, Squatrito S, Milardi D, Vigneri R. Insulin has multiple anti-amyloidogenic effects on human neuronal cells. *Endocrinology*. 2013;154(1):375-87.
27. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, et al. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science*. 2004;304(5675):1325-8.
28. Prudente S, Scarpelli D, Chandalia M, Zhang YY, Morini E, Del Guerra S, et al. The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):190-6.
29. Prudente S, Hribal ML, Flex E, Turchi F, Morini E, De Cosmo S, et al. The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy. *Diabetes*. 2005;54(9):2807-11.
30. Ishihara H, Sasaoka T, Kagawa S, Murakami S, Fukui K, Kawagishi Y, et al. Association of the polymorphisms in the 5'-untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population. *FEBS Lett*. 2003;554(3):450-4.
31. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.
32. Trout KK, Homko C, Tkacs NC. Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs*. 2007;8(4):305-18.
33. Kim JK. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods Mol Biol*. 2009;560:221-38.
34. Saad MF, Anderson RL, Laws A, Watanabe RM, Kades WW, Chen YD, et al. A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance. *Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. *Diabetes*. 1994;43(9):1114-21.
35. Uwaifo GI, Parikh SJ, Keil M, Elberg J, Chin J, Yanovski JA. Comparison of insulin sensitivity, clearance, and secretion estimates using euglycemic and hyperglycemic clamps in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2899-905.
36. Tam CS, Xie W, Johnson WD, Cefalu WT, Redman LM, Ravussin E. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1605-10.
37. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.

38. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2402-10.
39. Brown RJ, Yanovski JA. Estimation of insulin sensitivity in children: methods, measures and controversies. *Pediatr Diabetes.* 2014;15(3):151-61.
40. Schwartz B, Jacobs DR, Jr., Moran A, Steinberger J, Hong CP, Sinaiko AR. Measurement of insulin sensitivity in children: comparison between the euglycemic-hyperinsulinemic clamp and surrogate measures. *Diabetes Care.* 2008;31(4):783-8.
41. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. 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):e500-3.
42. Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J, Elberg J, Parikh SJ, Yanovski JA. Indices of insulin action, disposal, and secretion derived from fasting samples and clamps in normal glucose-tolerant black and white children. *Diabetes Care.* 2002;25(11):2081-7.
43. Garcia Cuartero B, Garcia Lacalle C, Jimenez Lobo C, Gonzalez Vergaz A, Calvo Rey C, Alcazar Villar MJ, et al. [The HOMA and QUICKI indexes, and insulin and C-peptide levels in healthy children. Cut off points to identify metabolic syndrome in healthy children]. *An Pediatr (Barc).* 2007;66(5):481-90.
44. Caceres M, Teran CG, Rodriguez S, Medina M. Prevalence of insulin resistance and its association with metabolic syndrome criteria among Bolivian children and adolescents with obesity. *BMC Pediatr.* 2008;8:31.
45. Fleischman A, Rhodes ET. Management of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes in children: consensus and controversy. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2009;2:185-202.
46. Fleischman A, Kron M, Systrom DM, Hrovat M, Grinspoon SK. Mitochondrial function and insulin resistance in overweight and normal-weight children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4923-30.
47. Nelson RA, Bremer AA. Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(1):1-14.
48. Davila-Torres J, Gonzalez-Izquierdo JJ, Barrera-Cruz A. [Obesity in Mexico]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(2):240-9.
49. Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol.* 2008;159 Suppl 1:S67-74.
50. Levy-Marchal C, Arslanian S, Cutfield W, Sinaiko A, Druet C, Marcovecchio ML, et al. Insulin resistance in children: consensus, perspective, and future directions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(12):5189-98.
51. Weiss R, Kaufman FR. Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S310-6.
52. Romero-Martinez M, Shamah-Levy T, Franco-Nunez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutierrez JP, et al. [National Health and Nutrition Survey 2012: design and coverage]. *Salud Publica Mex.* 2013;55 Suppl 2:S332-40.
53. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep.* 2010;10(6):498-505.
54. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738.
55. Groop LC. The molecular genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med.* 1997;241(2):95-101.
56. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1:S39-48.

57. In: Hernandez LM, Blazer DG, editors. Genes, Behavior, and the Social Environment: Moving Beyond the Nature/Nurture Debate. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC)2006.
58. Sorof JM, Lai D, Turner J, Poffenbarger T, Portman RJ. Overweight, ethnicity, and the prevalence of hypertension in school-aged children. *Pediatrics*. 2004;113(3 Pt 1):475-82.
59. Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Papakonstantinou E, Zampelas A, et al. The relationship between dietary habits, blood glucose and insulin levels among people without cardiovascular disease and type 2 diabetes; the ATTICA study. *Rev Diabet Stud*. 2005;2(4):208-15.
60. Mayer EJ, Newman B, Quesenberry CP, Jr., Friedman GD, Selby JV. Alcohol consumption and insulin concentrations. Role of insulin in associations of alcohol intake with high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2190-7.
61. Cavero-Redondo I, Peleteiro B, Alvarez-Bueno C, Artero EG, Garrido-Miguel M, Martinez-Vizcaino V. The Effect of Physical Activity Interventions on Glycosylated Haemoglobin (HbA1c) in Non-diabetic Populations: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Med*. 2018.
62. Chu L, Morrison KM, Riddell MC, Raha S, Timmons BW. Effect of 7 days of exercise on exogenous carbohydrate oxidation and insulin resistance in children with obesity. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018.
63. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009;578:23-39.
64. Ritenbaugh C, Goodby CS. Beyond the thrifty gene: metabolic implications of prehistoric migration into the New World. *Med Anthropol*. 1989;11(3):227-36.
65. Maple-Brown L, Hodge A, Cunningham J, Celermajer DS, O'Dea K. Risk factors for cardiovascular disease do not fully explain differences in carotid intima-media thickness between Indigenous and European Australians without diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(2):189-94.
66. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013;59(1):138-43.
67. Schulz LO, Chaudhari LS. High-Risk Populations: The Pimas of Arizona and Mexico. *Curr Obes Rep*. 2015;4(1):92-8.
68. Esparza-Romero J, Valencia ME, Urquidez-Romero R, Chaudhari LS, Hanson RL, Knowler WC, et al. Environmentally Driven Increases in Type 2 Diabetes and Obesity in Pima Indians and Non-Pimas in Mexico Over a 15-Year Period: The Maycoba Project. *Diabetes Care*. 2015;38(11):2075-82.
69. Martinez Alvarez JR. [The energy density and the nutritional quality of diet depending on their sugar content]. *Nutr Hosp*. 2013;28 Suppl 4:57-63.
70. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157(8):821-7.
71. Pena-Espinoza BI, Granados-Silvestre MLA, Sanchez-Pozos K, Ortiz-Lopez MG, Menjivar M. Metabolic syndrome in Mexican children: Low effectiveness of diagnostic definitions. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2017;64(7):369-76.
72. Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med*. 2005;47(4):201-10.
73. Rosenson RS. New approaches in the intensive management of cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30(5):241-79.

74. Brown AE, Walker M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiol Rep.* 2016;18(8):75.
75. Stancakova A, Laakso M. Genetics of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):243-52.
76. Joy T, Hegele RA. Genetics of metabolic syndrome: is there a role for phenomics? *Curr Atheroscler Rep.* 2008;10(3):201-8.
77. Povel CM, Boer JM, Reiling E, Feskens EJ. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev.* 2011;12(11):952-67.
78. Gunczler P, Lanes R. Relationship between different fasting-based insulin sensitivity indices in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19(3):259-65.
79. Costa B, Cabre JJ, Martin F. [Metabolic syndrome, resistance to insulin and diabetes. What is hidden beneath the tip of the iceberg?]. *Aten Primaria.* 2003;31(7):436-45.
80. Teixeira FC, Pereira FE, Pereira AF, Ribeiro BG. Metabolic syndrome's risk factors and its association with nutritional status in schoolchildren. *Prev Med Rep.* 2017;6:27-32.
81. Kim B, Feldman EL. Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Exp Mol Med.* 2015;47:e149.
82. Juarez-Lopez C, Klunder-Klunder M, Medina-Bravo P, Madrigal-Azcarate A, Mass-Diaz E, Flores-Huerta S. Insulin resistance and its association with the components of the metabolic syndrome among obese children and adolescents. *BMC Public Health.* 2010;10:318.
83. Castro AV, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(6):600-9.
84. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 2013;7(1):14-24.
85. Norris JM, Rich SS. Genetics of glucose homeostasis: implications for insulin resistance and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2091-6.
86. Palmer ND, Langefeld CD, Ziegler JT, Hsu F, Haffner SM, Fingerlin T, et al. Candidate loci for insulin sensitivity and disposition index from a genome-wide association analysis of Hispanic participants in the Insulin Resistance Atherosclerosis (IRAS) Family Study. *Diabetologia.* 2010;53(2):281-9.
87. Mohlke KL, Boehnke M. Recent advances in understanding the genetic architecture of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet.* 2015;24(R1):R85-92.
88. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53.
89. Scott RA, Fall T, Pasko D, Barker A, Sharp SJ, Arriola L, et al. Common genetic variants highlight the role of insulin resistance and body fat distribution in type 2 diabetes, independent of obesity. *Diabetes.* 2014;63(12):4378-87.
90. Watanabe RM. The genetics of insulin resistance: Where's Waldo? *Curr Diab Rep.* 2010;10(6):476-84.
91. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of H, Mit LU, Novartis Institutes of BioMedical R, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science.* 2007;316(5829):1331-6.
92. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(7):1096-116.
93. Morcillo S, Martin-Nunez GM, Rojo-Martinez G, Almaraz MC, Garcia-Escobar E, Mansego ML, et al. ELOVL6 genetic variation is related to insulin sensitivity: a new candidate gene in energy metabolism. *PLoS One.* 2011;6(6):e21198.
94. de Luis Roman DA, Aller R, Izaola Jauregui O, Gonzalez Sagrado M, Conde Vicente R, de la Fuente Salvador B, et al. Relation of -55CT polymorphism of uncoupling

protein 3 gene with fat mass and insulin resistance in morbidly obese patients. *Metabolism*. 2010;59(4):608-12.

95. Eisenach JH, Wittwer ED.  $\beta$ -Adrenoceptor gene variation and intermediate physiological traits: prediction of distant phenotype. *Exp Physiol*. 2010;95(7):757-64.

96. Komurcu-Bayrak E, Onat A, Yuzbasiogullari B, Mononen N, Laaksonen R, Kahonen M, et al. The APOE -219G/T and +113G/C polymorphisms affect insulin resistance among Turks. *Metabolism*. 2011;60(5):655-63.

97. Ferguson JF, Phillips CM, Tierney AC, Perez-Martinez P, Defoort C, Helal O, et al. Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(3):794-801.

98. Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, et al. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes*. 2007;56(12):3105-11.

99. Hertel JK, Johansson S, Raeder H, Midthjell K, Lyssenko V, Groop L, et al. Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia*. 2008;51(6):971-7.

100. Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, et al. Strong association of common variants in the CDKN2A/CDKN2B region with type 2 diabetes in French Europids. *Diabetologia*. 2008;51(5):821-6.

101. Gamboa-Melendez MA, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macias H, Vazquez-Cardenas P, Ordonez-Sanchez ML, Rodriguez-Guillen R, et al. Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes*. 2012;61(12):3314-21.

102. Lara-Riegos JC, Ortiz-Lopez MG, Pena-Espinoza BI, Montufar-Robles I, Pena-Rico MA, Sanchez-Pozos K, et al. Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4alpha, KCNJ11, PPARgamma, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes. *Gene*. 2015;565(1):68-75.

103. Grant SF. Understanding the elusive mechanism of action of TCF7L2 in metabolism. *Diabetes*. 2012;61(11):2657-8.

104. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.

105. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodriguez-Cruz M, Miliar-Garcia A, et al. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes*. 2008;57(2):509-13.

106. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, Riano D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes*. 2007;56(7):1881-7.

107. Salinas CA, Cruz-Bautista I, Mehta R, Villarreal-Molina MT, Perez FJ, Tusie-Luna MT, et al. The ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1 (ABC-A1) and type 2 diabetes: an association beyond HDL cholesterol. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3(4):264-7.

108. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*. 2010;42(2):105-16.

109. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 2009;41(10):1110-5.
110. Hanson RL, Guo T, Muller YL, Fleming J, Knowler WC, Kobes S, et al. Strong parent-of-origin effects in the association of KCNQ1 variants with type 2 diabetes in American Indians. *Diabetes.* 2013;62(8):2984-91.
111. Kong X, Zhao Q, Xing X, Zhang B, Zhang X, Hong J, et al. Genetic Variants Associated with Lipid Profiles in Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135145.
112. Chen XD, Yang YJ, Li SY, Peng QQ, Zheng LJ, Jin L, et al. Several polymorphisms of KCNQ1 gene are associated with plasma lipid levels in general Chinese populations. *PLoS One.* 2012;7(3):e34229.
113. Gao K, Wang J, Li L, Zhai Y, Ren Y, You H, et al. Polymorphisms in Four Genes (KCNQ1 rs151290, KLF14 rs972283, GCKR rs780094 and MTNR1B rs10830963) and Their Correlation with Type 2 Diabetes Mellitus in Han Chinese in Henan Province, China. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3).
114. Dimas AS, Lagou V, Barker A, Knowles JW, Magi R, Hivert MF, et al. Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes.* 2014;63(6):2158-71.
115. Huerta-Chagoya A, Vazquez-Cardenas P, Moreno-Macias H, Tapia-Maruri L, Rodriguez-Guillen R, Lopez-Vite E, et al. Genetic determinants for gestational diabetes mellitus and related metabolic traits in Mexican women. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126408.
116. Mohas M, Kisfali P, Jaromi L, Maasz A, Feher E, Csongei V, et al. GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness? *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:79.
117. Bi M, Kao WH, Boerwinkle E, Hoogeveen RC, Rasmussen-Torvik LJ, Astor BC, et al. Association of rs780094 in GCKR with metabolic traits and incident diabetes and cardiovascular disease: the ARIC Study. *PLoS One.* 2010;5(7):e11690.
118. Ramirez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zarate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex.* 2013;149(2):220-8.
119. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8611-6.
120. Martinez-Cortes G, Salazar-Flores J, Fernandez-Rodriguez LG, Rubi-Castellanos R, Rodriguez-Loya C, Velarde-Felix JS, et al. Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *J Hum Genet.* 2012;57(9):568-74.
121. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernandez-Lopez JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science.* 2014;344(6189):1280-5.
122. Romero-Hidalgo S, Ochoa-Leyva A, Garcarrubio A, Acuna-Alonzo V, Antunez-Arguelles E, Balcazar-Quintero M, et al. Demographic history and biologically relevant genetic variation of Native Mexicans inferred from whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 2017;8(1):1005.
123. Acuna-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, Hunemeier T, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet.* 2010;19(14):2877-85.

124. Ramirez-Valverde AG, Antunez-Ortiz DL, Mendez-Beleche A, Flores-Alfaro E, Ascencio-Montiel IJ, Cruz M. [Copy number variation: markers and predictors for type 2 diabetes]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(3):348-55.
125. Cho J, Hong H, Park S, Kim S, Kang H. Insulin Resistance and Its Association with Metabolic Syndrome in Korean Children. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8728017.
126. Johnson SR, Leo PJ, McInerney-Leo AM, Anderson LK, Marshall M, McGown I, et al. Whole-exome sequencing for mutation detection in pediatric disorders of insulin secretion: Maturity onset diabetes of the young and congenital hyperinsulinism. *Pediatr Diabetes.* 2018.
127. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Hum Mutat.* 2011;32(8):894-9.
128. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(4):533-7.
129. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7 20.
130. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
131. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat.* 2013;34(1):57-65.
132. Aken BL, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Bernsdorff F, Bhai J, et al. Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D635-D42.
133. Pinero J, Queralt-Rosinach N, Bravo A, Deu-Pons J, Bauer-Mehren A, Baron M, et al. DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database (Oxford).* 2015;2015:bav028.
134. Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, et al. GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W115-22.
135. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014;122(7):384-6.
136. Marcovecchio ML, Mohn A, Chiarelli F. Obesity and insulin resistance in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51 Suppl 3:S149-50.
137. Abdullah A. The Double Burden of Undernutrition and Overnutrition in Developing Countries: an Update. *Curr Obes Rep.* 2015;4(3):337-49.
138. Ozanne SE, Hales CN. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(9):368-73.
139. Gomez-Diaz RA, Wachter-Rodarte NH. [Childhood obesity and dyslipidemia]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014;52 Suppl 1:S102-8.
140. Gamboa-Melendez MA, Galindo-Gomez C, Juarez-Martinez L, Gomez FE, Diaz-Diaz E, Avila-Arcos MA, et al. Novel association of the R230C variant of the ABCA1 gene with high triglyceride levels and low high-density lipoprotein cholesterol levels in Mexican school-age children with high prevalence of obesity. *Arch Med Res.* 2015;46(6):495-501.
141. Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sanchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, Romero-Hidalgo S, et al. Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta.* 2010;411(17-18):1214-7.
142. Rangel-Baltazar E, Villalpando S. [Waist-to-height ratio as a predictor of blood pressure in Mexican children. Follow-up study]. *Rev Invest Clin.* 2014;66(1):17-23.
143. Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, et al. Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk



- factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(11):1453-8.
144. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010;140(3):399-410.
145. Hirschler V, Oestreicher K, Maccallini G, Aranda C. Relationship between obesity and metabolic syndrome among Argentinean elementary school children. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):435-41.
146. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(1):108-13.
147. Maffei C, Manfredi R, Trombetta M, Sordelli S, Storti M, Benuzzi T, et al. Insulin sensitivity is correlated with subcutaneous but not visceral body fat in overweight and obese prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2122-8.
148. Bharadwaj S, Ginoya S, Tandon P, Gohel TD, Guirguis J, Vallabh H, et al. Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2016;4(4):272-80.
149. Ju SY, Lee JY, Kim DH. Association of metabolic syndrome and its components with all-cause and cardiovascular mortality in the elderly: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(45):e8491.
150. Borghi F, Seva-Pessoa B, Grassi-Kassisse DM. The adipose tissue and the involvement of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiometabolic syndrome. *Cell Tissue Res*. 2016;366(3):543-8.
151. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006;38(3):320-3.
152. Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, et al. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet*. 2007;71(4):359-66.
153. Aguilar-Salinas CA, Munoz-Hernandez LL, Cobos-Bonilla M, Ramirez-Marquez MR, Ordonez-Sanchez ML, Mehta R, et al. The R230C variant of the ATP binding cassette protein A1 (ABCA1) gene is associated with a decreased response to glyburide therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2013;62(5):638-41.
154. Rickels MR, Goeser ES, Fuller C, Lord C, Bowler AM, Doliba NM, et al. Loss-of-function mutations in ABCA1 and enhanced beta-cell secretory capacity in young adults. *Diabetes*. 2015;64(1):193-9.
155. Vergeer M, Brunham LR, Koetsveld J, Kruit JK, Verchere CB, Kastelein JJ, et al. Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33(4):869-74.
156. Brunham LR, Kruit JK, Hayden MR, Verchere CB. Cholesterol in beta-cell dysfunction: the emerging connection between HDL cholesterol and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2010;10(1):55-60.
157. Baroni MG, Arca M, Sentinelli F, Buzzetti R, Capici F, Lovari S, et al. The G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin-resistance. *Diabetologia*. 2001;44(3):367-72.
158. Trombetta M, Dauriz M, Bonetti S, Travia D, Boselli L, Santi L, et al. Is common genetic variation at IRS1, ENPP1 and TRIB3 loci associated with cardiometabolic phenotypes in type 2 diabetes? An exploratory analysis of the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 5. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(3):232-8.
159. Sharma R, Prudente S, Andreozzi F, Powers C, Mannino G, Bacci S, et al. The type 2 diabetes and insulin-resistance locus near IRS1 is a determinant of HDL cholesterol and triglycerides levels among diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):157-60.

160. Torekov SS, Iepsen E, Christiansen M, Linneberg A, Pedersen O, Holst JJ, et al. KCNQ1 long QT syndrome patients have hyperinsulinemia and symptomatic hypoglycemia. *Diabetes*. 2014;63(4):1315-25.
161. Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, et al. Paternal allelic mutation at the *Kcnq1* locus reduces pancreatic beta-cell mass by epigenetic modification of *Cdkn1c*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):8332-7.
162. Abbott GW, Tai KK, Neverisky DL, Hansler A, Hu Z, Roepke TK, et al. KCNQ1, KCNE2, and Na<sup>+</sup>-coupled solute transporters form reciprocally regulating complexes that affect neuronal excitability. *Sci Signal*. 2014;7(315):ra22.
163. Yang M, Ren Y, Lin Z, Tang C, Jia Y, Lai Y, et al. Kruppel-like factor 14 increases insulin sensitivity through activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell Signal*. 2015;27(11):2201-8.
164. Wang J, Zhang J, Shen J, Hu D, Yan G, Liu X, et al. Association of KCNQ1 and KLF14 polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus: A global meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014;75(4):342-7.
165. Shtir C, Aldahmesh MA, Al-Dahmash S, Abboud E, Alkuraya H, Abouammoh MA, et al. Exome-based case-control association study using extreme phenotype design reveals novel candidates with protective effect in diabetic retinopathy. *Hum Genet*. 2016;135(2):193-200.
166. Warr A, Robert C, Hume D, Archibald A, Deeb N, Watson M. Exome Sequencing: Current and Future Perspectives. *G3 (Bethesda)*. 2015;5(8):1543-50.
167. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 8:S1.