



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ESTUDIO DE VARIANTES DEL NÚMERO DE COPIAS EN GENES
CANDIDATO ASOCIADOS A OBESIDAD INFANTIL”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A :

M. en C. DIANA LIZZETE ANTÚNEZ ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EUGENIA FLORES ALFARO

CODIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ

CHILPANCINGO, GRO. FEBRERO DE 2017

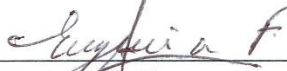


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

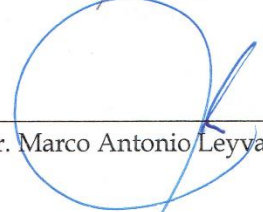
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de enero del dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **"Estudio de variantes del número de copias en genes candidato asociados a obesidad infantil"**, presentada por la alumna Diana Lizzete Antúnez Ortíz, para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


 Dra. Eugenia Flores Alfaro
 Dirección de tesis


 Dra. Mónica Espinoza Rojo

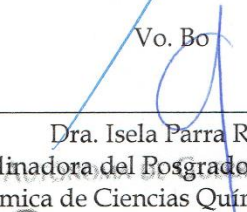

 Dra. Luz del Carmen Alarcón Rivera

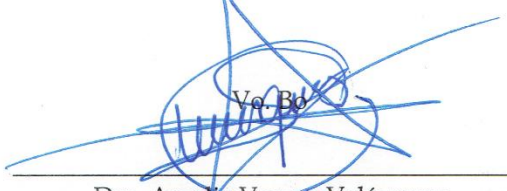

 Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez


 Dr. Miguel Cruz López

Vo. Bo

Vo. Bo


 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinadora del Posgrado de la Unidad
 Académica de Ciencias Químico Biológicas


 Dra. Amalia Vences Velázquez
 Directora de la Unidad Académica de Ciencias
 Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en el Laboratorio Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Miguel Cruz López

Y con la asesoría de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) con el financiamiento SALUD-2013-C01-201471 (FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE), por la fundación IMSS A.C. y por la Fundación Gonzalo Río Arronte I.A.P

Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, la M. C. Diana Lizzete Antúnez Ortiz fue beneficiaria de beca **CONACYT**.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Dra. Eugenia Flores Alfaro
Dr. Miguel Cruz López

Gracias por el apoyo brindado, la dedicación prestada.
Gracias por la confianza que depositaron en mí para la
realización de esta investigación.

A mis asesores:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Gracias por todo el apoyo brindado durante la revisión de
este trabajo y por las valiosas aportaciones hechas al
mismo.

A mis padres:

MC. Neftali Antúnez Hernández
Sra. Rosa María Ortiz Alejo

Mi profundo agradecimiento por su constante apoyo moral
y económico. Gracias por impulsarme a seguir adelante.

A mis compañeros del CMN s.XXI y de la FCQB:

Araceli, Dr. Fernando, Dr. Jaime, Dr. Jesús, Dr. Valladares, Javier, José Ángel,
Paola, Aby, Diana.

Gracias por la amistad que me han brindado y por el
esfuerzo que han puesto para concluir este trabajo.

DEDICATORIAS

Para mis hijas **Amy** y **Betsy** con todo mi amor, porque ustedes son el motivo por el que he luchado para lograr esta meta.

Para mi hermano **Kevin Daniel**, sabes que siempre puedes contar conmigo.

INDICE

	Pág.
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	
1. Obesidad	3
1.1 Causas y consecuencias de la obesidad	4
2. Variantes del número de copias	5
2.1 CNVs y obesidad	7
IV. Capítulos	
Capítulo I: Artículo original: "Copy number variations in candidate genes and intergenic regions affect body mass index and abdominal obesity in Mexican children"	9
Capítulo II: Resultados adicionales	35
Capítulo III: Artículo de revisión: "Variaciones de número de copias: marcadores y predictores de diabetes tipo 2"	39
V. Discusión	48
VI. Referencias	50

Estudio de variantes del número de copias (CNVs) en el genoma de niños con obesidad

I. RESUMEN

La obesidad es uno de los problemas de salud más importantes en el mundo, en México la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños en edad escolar es del 34.4%. El aumento de peso corporal inicia durante la infancia, en su origen, se involucran factores ambientales, del estilo de vida y la predisposición genética. Se han identificado aproximadamente 97 loci con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), asociados a obesidad y alteraciones en el índice de masa corporal (IMC), sin embargo, estos no explican la variabilidad fenotípica observada, sugiriendo que otras formas de variación en el DNA pueden explicar el resto de la heredabilidad. Las variaciones en el número de copias (CNV), son fragmentos de DNA mayores a 1 kb y comprenden inserciones, eliminaciones, traslocaciones e inversiones del material genómico, pueden modificar los niveles de expresión tanto del RNAm como de la proteína. El objetivo del presente estudio fue evaluar la relación de CNVs en genes candidato y regiones intergénicas con la obesidad en niños mexicanos. Se llevó a cabo un estudio en 1423 niños de 6 a 12 años de edad, se realizaron mediciones antropométricas, presión arterial, glucosa, triglicéridos, colesterol, LDL-col, HDL-col, adiponectina, leptina, insulina IL-6 e IL-10. El número de copias se determinó por PCR dúplex en tiempo real; se analizaron trece genes y cuatro regiones intergénicas, encontrando que las duplicaciones en los genes LEPR y NEGR1 se asocian con la disminución del IMC, de la circunferencia de cintura (CC) y el riesgo de obesidad abdominal (OA); mientras que las duplicaciones del gen ARHGEF4, CPXCR1 y las regiones intergénicas 12q15c, 15q21.1a y 22q11.21d se relacionan con un aumento significativo en el IMC, CC y del riesgo a OA. Por otro lado, las eliminaciones en el gen INS contribuyen al aumento del IMC, de la CC y del riesgo a OA. Nuestros datos sugieren una posible contribución de las CNVs en estas regiones al desarrollo de obesidad, principalmente abdominal, en niños mexicanos.

II. ABSTRACT

Obesity is one of the major health problems in the world, in Mexico the combined prevalence of overweight and obesity in school-age children is 34.4%. The weight gain starts during childhood, in its origin, environmental factors, lifestyle and genetic predisposition is involved. Have identified approximately 97 loci with single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with obesity and impaired body mass index (BMI), however these do not explain the observed phenotypic variability, suggesting that other forms of variation in the DNA may explain the rest of heritability. Copy number variation (CNV) are long fragments of DNA, typically greater than 1 kb and comprise insertions, deletions, translocations and inversions of genomic material, can modify the expression levels of both mRNA and protein. The aim of this study was to evaluate the association of CNVs in candidate genes and intergenic regions with obesity in Mexican children. A study was conducted on 1423 children aged 6-12 years, anthropometric measurements, blood pressure, glucose, triglycerides, cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, adiponectin, leptin, insulin, IL-6 and IL-10 were made. The copy number was determined by duplex real-time PCR; thirteen genes and four intergenic regions were analyzed, finding that duplications in *LEPR* and *NEGR1* genes are associated with decreased BMI, waist circumference (WC) and the risk of abdominal obesity (OA); while duplications in *ARHGEF4* and *CPXCR1* genes, and intergenic regions 12q15c, 15q21.1a and 22q11.21d are associated with a significant increase in BMI, WC and OA risk. On the other hand, deletions in the *INS* gene contribute to increased BMI, WC and OA risk. Our data suggest a possible contribution of CNVs in these regions to the development of obesity, especially abdominal, in Mexican children.

III. INTRODUCCIÓN

1. Obesidad

Se define a la obesidad como la acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo en diversos sitios anatómicos que llevan a un aumento en el peso corporal. El exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad) es reconocido actualmente como uno de los retos más importantes de salud pública en el mundo, dada su magnitud, la rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que lo padece. El sobrepeso y la obesidad incrementan significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), mortalidad prematura y el costo social de la salud. Además, afecta seriamente la independencia, el bienestar psicológico y en general la calidad de vida (Hussain and Bloom, 2011).

Se estima que 90 % de los casos de diabetes tipo 2 (DT2) son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. Otras ECNT relacionadas son la hipertensión arterial, las dislipidemias, la enfermedad coronaria, la apnea del sueño, la enfermedad vascular cerebral, la osteoartritis y algunos cánceres (de mama, esófago, colon, endometrio y riñón, entre otros). (Mitchell *et al.*, 2011).

De acuerdo con los hallazgos de la ENSANUT 2016 en la población en edad escolar (de 5 a 11 años de edad), la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en 2016, a partir de los criterios de la OMS, fue de 33.2 % (17.9 y 15.3 %, respectivamente), 1.2 % menor en comparación a la reportada en 2012 (Gutierrez *et al.*, 2012); sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Para las niñas, esta cifra es de 32.8 % (20.6 y 12.2 %, respectivamente) y para los niños es 33.7 % (15.4 y 18.3 %, respectivamente). Estas prevalencias en niños en edad escolar representan alrededor de cinco millones de niños con sobrepeso y obesidad en el ámbito nacional (Hernandez-Avila *et al.*, 2016).

1.1 Causas y consecuencias de la obesidad

En su origen, se involucran factores genéticos y ambientales que determinan un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de grasa corporal más allá del valor esperado según el género, la talla y la edad (Cole *et al.*, 2000). El aumento de peso corporal es un proceso gradual que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, a partir de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, en el que se involucran la susceptibilidad genética y los estilos de vida y del entorno, con influencia de diversos determinantes subyacentes, como la globalización, la cultura, la condición económica, la educación, la urbanización y el entorno político y social. En este fenómeno juegan un papel importante tanto el comportamiento individual, como el entorno familiar, comunitario y el ambiente social (Ichihara and Yamada, 2008, Wells, 2012).

Se ha definido que el peso, el índice de masa corporal (IMC), la cantidad de grasa subcutánea y de grasa visceral están relacionadas con la resistencia a la insulina (RI) y con las alteraciones en los índices de homeostasia de los niveles plasmáticos de glucosa-insulina, es decir, aquellos pacientes que presentan sobrepeso u obesidad con un exceso de grasa visceral, muestran un estado de RI más severo (Tchoukalova *et al.*, 2008), además, la síntesis de diversas citocinas por parte del tejido adiposo contribuyen a la RI y promueven estados proinflamatorios, protrombóticos y prohipertensivos. El estado secretorio del tejido adiposo puede ser modificado por cambios en la composición celular del tejido, incluyendo alteraciones en el número, fenotipo y localización de células inmunes y vasculares. La expresión de adipocinas puede también variar dependiendo del sitio de depósito del tejido adiposo, los individuos con adiposidad central producen niveles más elevados en comparación a los que tienen la adiposidad subcutánea (Ouchi *et al.*, 2011, Lumeng and Saltiel, 2011).

En 1993, se identificó al factor de necrosis tumoral (TNF) como un producto proinflamatorio del tejido adiposo que es inducido en estados de obesidad y DT2,

señalando la existencia de inflamación en obesidad (Hotamisligil *et al.*, 1993). Posteriormente se descubrió a la leptina como proteína secretada específicamente por el tejido adiposo, cuya función es regular la ingesta de alimentos y el gasto energético de una manera endócrina (Zhang *et al.*, 1994). Además, la identificación del inhibidor del activador de plasminógeno 1, un inhibidor de la fibrinólisis, como una adipocina sobreexpresada en los depósitos de grasa visceral, sugieren la presencia de un estado protrombótico en obesidad (Cesari *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, la adiponectina fue identificada como una adipocina exclusiva del adipocito cuya expresión es disminuida en obesidad, es una hormona con efectos antidiabéticos y antiaterogénicos, debido a que regula el metabolismo energético del organismo, es decir, estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa, por otro lado, posee efectos antiinflamatorios ya que disminuye la expresión de TNF- α (Matsuzawa, 2010), estos hallazgos indican que la disfunción metabólica es debida al exceso de tejido adiposo y a un desbalance en la expresión de adipocinas pro y antiinflamatorias que contribuyen al desarrollo de las comorbilidades de la obesidad (Misra and Khurana, 2008).

2. Variantes en el número de copias (CNVs)

Como se ha descrito anteriormente, los factores ambientales juegan un papel importante en la obesidad, sin embargo, las variantes genéticas también contribuyen sustancialmente a su patogénesis. Numerosos estudios epidemiológicos han reconocido la contribución de factores genéticos a la susceptibilidad individual a la obesidad, y se ha efectuado un progreso sustancial en identificar genes de susceptibilidad y entender los mecanismos moleculares de la obesidad. En el genoma humano se presentan variaciones como resultado de los cambios en su secuencia y estructura. Las variaciones en la secuencia comprenden a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y a pequeñas inserciones y eliminaciones de unos pocos nucleótidos. La variación estructural

comprende las variaciones del número de copias (CNV) y aneuploidías cromosómicas (Feuk *et al.*, 2006).

Estas CNV incluyen eliminaciones, inserciones y duplicaciones de más de 1 kb hasta varios Mb, también incluyen eventos neutros de tamaño similar, sin ganancia o pérdida de contenido genómico, estos pueden ser inversiones de la secuencia, en el que un tramo de DNA se ha intercambiado entre dos puntos finales, o translocaciones cromosómicas equilibradas, en el que dos cromosomas intercambian regiones de DNA en un genoma comparado a otro, juntos contribuyen considerablemente a la diversidad genómica en los seres humanos, se calcula que al menos el 12% del genoma humano contiene CNVs (Redon *et al.*, 2006). Son comunes entre los individuos sanos, de hecho, dos personas serán diferentes en el número de copias alrededor del 0.78% de sus genomas (Conrad *et al.*, 2010).

Inicialmente, las CNVs fueron identificadas durante los estudios específicos de locus, en los cuales se analizan regiones cromosomales específicas para detectar anomalías (Barber *et al.*, 1998) o durante el análisis de las familias de genes, aquellas donde las secuencias de los DNA de sus miembros comparten homología y sus productos están funcionalmente relacionados. Se encuentran juntos en el cromosoma (rRNA y tRNA) o dispersos en diferentes regiones cromosómicas (OLR) (Trask *et al.*, 1998).

Las CNVs contenidas en un gen pueden influenciar los niveles de expresión tanto del RNAm como de la proteína. Además, es posible que las CNVs afecten directa o indirectamente la expresión de genes vecinos, por ejemplo, la eliminación de regiones reguladoras (como aumentadores) disminuye la expresión del gen blanco y la cantidad de proteína producida, por otro lado, la pérdida de regiones exónicas producen isoformas de la proteína (Reymond *et al.*, 2007).

Recientemente se ha descrito la transcripción inducida por quimeras, en la cual los exones en tándem son transcritos en una sola molécula de RNAm, que parece ser generalizada, que afecta a más de la mitad de los loci investigados (Parra *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos genes podrían tener varias regiones reguladoras alternativas, independientes de promotores, y con frecuencia se superponen sus límites con los de otros genes. Es posible que estas regiones, todavía no descritas, de un gen cercano a una CNV, es posible que se modifique el nivel de expresión de este gen (Perry, 2008, Korbelt *et al.*, 2008).

2.1 Variaciones en el genoma y obesidad

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han permitido la identificación de diversos loci asociados a obesidad y alteraciones en el índice de masa corporal (IMC), sin embargo, estos solo explican alrededor del 10% de la variabilidad fenotípica observada en la obesidad, sugiriendo que otras formas de variación en el DNA pueden explicar el resto de la heredabilidad. (Bauer *et al.*, 2009, Speliotes *et al.*, 2010). Recientemente en un metanálisis se identificaron 97 loci en el que se proporciona evidencia de genes y vías particulares que afectan el IMC, incluyendo la plasticidad sináptica y las vías de actividad del receptor de glutamato que responden a los cambios en la alimentación y el ayuno (Locke *et al.*, 2015).

En otro extenso metanálisis sobre niños con ascendencia europea residentes de América del Norte, Australia y Europa, describe dos nuevos loci para obesidad extrema que parecen estar relacionadas con el aumento en la adiposidad en los primeros 18 años de vida, mostrando resultados consistentes con estudios previos hechos en adultos (Bradfield *et al.*, 2012). En un estudio de todo el genoma en 47541 niños identificaron tres loci con diferencias por grupos de edad, que no se habían asociado con fenotipos relacionados con adiposidad anteriormente (Felix *et al.*, 2016). Sin embargo, mucho se desconoce acerca de las variaciones en el genoma humano y su relación con los cambios en el IMC.

Diversos estudios han demostrado la asociación de las CNVs con obesidad; Jeon *et al.* (2010) en una población de adultos koreanos no diabéticos, encuentran que las CNVs en el gen *LEPR* se asocian con el IMC y el porcentaje de grasa corporal, Willer *et al.* (2009) en una población con ancestría europea relaciona las CNVs en el gen *NEGR1* con el IMC, Irvin *et al.* (2011), en una población de afroamericanos no diabéticos encuentra que las CNVs en los genes *ARHGEF4* y *DCK* se relacionan con resistencia a insulina (RI), por otro lado Bae *et al.* (2011), en población koreana, identificaron varias CNVs localizadas en regiones intergénicas asociadas a DT2.

Recientemente nuestro grupo de trabajo, en el primer estudio de CNVs en México, ha sugerido que tener un alto número de copias en el gen *AMY1* contribuye a la producción de amilasa salival, lo que mejora el metabolismo de lípidos y carbohidratos en niños mexicanos (Mejia-Benitez *et al.*, 2015), por lo cual es necesario analizar otras regiones genómicas en esta población, que permitan una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. Este trabajo tuvo como finalidad determinar el número de CNVs en genes candidato y regiones intergénicas para establecer nuevos factores de riesgo en el desarrollo de la obesidad y comorbilidades asociadas en niños mexicanos, así como brindar un marcador diagnóstico y de prevención para esta enfermedad, además de evaluar el perfil inflamatorio de los niños como marcadores tempranos que prevenga el desarrollo de trastornos metabólicos más severos.

IV. CAPÍTULOS

CAPITULO I:

“Copy number variations in candidate genes and intergenic regions affect body mass index and abdominal obesity in Mexican children”

Dear Dr. Flores-Alfaro,

The review process of Research Article 2432957 titled "**Copy number variations in candidate genes and intergenic regions affect body mass index and abdominal obesity in Mexican children**" by **Diana Lizzete Antúnez-Ortiz**, Eugenia Flores-Alfaro, Ana Burguete García, Amelie Bonnefond, Jesus Peralta-Romero, P. Froguel, Mónica Espinoza-Rojo and M. Cruz submitted to BioMed Research International has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been **accepted for publication** in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/2432957/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to BioMed Research International.

Best regards,

Sarah H. Elsea
elsea@bcm.edu

Copy number variations in candidate genes and intergenic regions affect body mass index and abdominal obesity in Mexican children

CNVs associated with BMI and abdominal obesity in Mexican children

Diana Lizzete Antúnez-Ortiz^{1,2*}, Eugenia Flores-Alfaro^{1*}, Ana Isabel Burguete-García³, Amélie Bonnefond^{4,5,6}, Jesús Peralta-Romero², Philippe Froguel^{4,5,6,7}, Mónica Espinoza-Rojo¹, Miguel Cruz²

1 Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero 39089, México.

2 Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, 06725, México.

3 Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, 62100, México.

4 CNRS-UMR8199, Lille Pasteur Institute, Lille, France.

5 Lille University, Lille, France

6 European Genomic Institute for Diabetes (EGID), FR 3508, Lille, France.

7 Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, United Kingdom.

*Authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Miguel Cruz, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores C.P. 06720. México D. F. E-mail: mcruz@yahoo.com

Email addresses: DLA-O: diana_antunez84@hotmail.com; EF-A: efloresa_2@hotmail.com; AIB-G: aburguete@insp.mx; AB: amelie@good.ibl.fr; JJP-R: drjperalta@hotmail.com; PF: p.froguel@imperial.ac.uk; MER: moniespinoza@yahoo.com

Introduction. Increase in body weight is a gradual process that usually begins in childhood and in adolescence as result of multiple interactions among environmental and genetic factors. This study aimed to analyze the relationship between copy number variants (CNVs) in five genes and four intergenic regions with obesity in Mexican children. *Methods.* We studied 1423 children aged 6–12 years old. Anthropometric measurements and blood levels of biochemical parameters were obtained. Identification of CNVs was performed by real-time PCR. The effect of CNVs on obesity or body composition was assessed using regression models adjusted for age, gender, and family history of obesity. *Results.* Gains in copy numbers of *LEPR* and *NEGR1* were associated with decreased body mass index (BMI), waist circumference (WC), and risk of abdominal obesity, whereas gain in *ARHGEF4* and *CPXCRI* and the intergenic regions 12q15c, 15q21.1a, and 22q11.21d, and losses in *INS* were associated with increased BMI and WC. *Conclusion.* Our results indicate a possible contribution of CNVs in *LEPR*, *NEGR1*, *ARHGEF4*, and *CPXCRI* and the intergenic regions 12q15c, 15q21.1a, and 22q11.21d to the development of obesity, particularly abdominal obesity in Mexican children.

1. Introduction

Excessive body weight is now recognized as an important public health problem worldwide. Obesity is associated with a variety of somatic and psychosocial co-morbidities including severe metabolic and cardiovascular complications that normally occur in adulthood. Obesity pathophysiologically induces a metabolically altered state in the majority of obese children, causing dyslipidemia, hypertension, steatosis, and impaired glucose metabolism [1]. In Mexico, based on the latest national health and nutrition survey (ENSANUT 2012), the combined prevalence of overweight and obese school-age children (5-11 years) was 34.4% (19.8% overweight and 14.6% obese) [2]. Increase in body weight is a gradual process that usually begins in childhood and adolescence as result of multiple interactions among environmental and genetic factors.

In a meta-analysis conducted by a group of researchers around the world, 97 loci (SNPs) were identified to be associated with body mass index (BMI), a measure generally used to define obesity and assess adiposity. These loci account for 2.7% of the variation in BMI and suggest that as much as 21% of BMI variation can be accounted for by common genetic variation. The researchers who performed this analysis provide evidence for particular genes and pathways that affect BMI, including synaptic plasticity and glutamate receptor activity pathways responding to changes in feeding and fasting [3]. An extensive North American, Australian, and European collaborative genome-wide meta-analysis on children of European ancestry, uncovered two new obesity loci that have the strongest evidence for association with elevated adiposity in the first 18 years of life, which overlap to a large extent in children as well as in adults [4]. A recent genome-wide study in 47541 children identified three significant loci, which have not been associated with adiposity-related phenotypes previously [5]. However, much is unknown about the variations in the human genome and their relationship with the changes in BMI.

Another type of variation in the structure of the DNA being studied is copy number variants (CNVs), usually defined as genomic segments of size ≥ 1 kb showing copy number variability among individuals in context of a reference genome. CNVs comprise deletions, duplications, insertions, and unbalanced translocations; their presence in the genome comprises approximately 12% of the individual variations and has an effect on gene expression [6]. Despite its importance, the mechanisms of CNV formation and the risk

factors involved are poorly understood. As are all mutations, CNVs are heritable and there is a risk of formation of new and deleterious CNVs because of exposure to environmental mutagens that interfere with DNA synthesis and genetic predisposition. At least two distinct pathways are known to be involved in the formation of CNVs-associated diseases: unequal meiotic recombination and replication errors. In particular, CNVs associated with diseases of polygenic origin such as autism [7], metabolic syndrome, obesity [8] and type 2 diabetes (T2D) [9] among others, have been identified.

Association studies of CNVs with obesity often involving extreme obesity phenotypes with or without syndromic features have identified candidate regions near the *NEGR1* locus and chromosome 10q11.22 [10], as well as on chromosomes 11q11 [11] and 10q26.3 [12] among others. A region within chromosome 16p11.2 is particularly well studied, deletions of which are associated with obesity and duplications are associated with an underweight phenotype [13]. Recently, our group analyzed *AMY1* in Mexican children, and the results showed a high copy number of the gene only in children with normal weight. This gene produces salivary amylase and results in improved lipid and carbohydrate metabolism. These variations might contribute to improved carbohydrate metabolism, particularly in the Mexican diet where carbohydrate-rich meals are consumed [14]. Therefore, it is necessary to study the other genes involved in the pathophysiology of obesity in children. The purpose of this study was to evaluate the association between CNVs in specific regions of *LEPR*, *NEGR1*, *ARHGEF4*, *CPXCRI*, and *INS*, and in four intergenic regions (1p36.33b, 12q15c, 15q21.1a, and 22q11.21d), and obesity in Mexican children. The studied regions were selected considering loci that were reported or tended to be associated with obesity, especially for those obesity-related alleles reported more than once or those that might affect the genes involved in obesity or related metabolic diseases.

2. Materials and Methods

2.1. Study participants. We studied 1423 Mexican children aged 6–12 years old, who were residents of Mexico City, not genetically related, did not have any chronic or infectious diseases at the time of the study, and were not under medical treatment. The program moderators provided a detailed explanation of the nature and purpose of the study to participants. The children who agreed to participate in the study, their parents, or legal

representatives provided an informed consent. The study protocol was approved by the National Committee and the Ethics Committee of the Mexican Social Security Institute (IMSS) and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki. For each of the participants, anthropometric indicators were determined and questionnaires for family history of metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes were filled out. Weight was measured on a digital scale (Seca, Hamburg, Germany), height was measured with a portable stadiometer (Seca 213, Hamburg, Germany), and waist circumference (WC) was measured just above the uppermost lateral border of the right ilium, at the end of a normal expiration with an anthropometric tape (Seca 201, Hamburg, Germany). Blood samples were obtained after 8 hours of fasting for biochemical measurements and DNA extraction.

2.2. Classification of body mass index and abdominal obesity. BMI was calculated and classified based on the reference tables for ages 2–20 years provided by the Center for Disease Control and Prevention, 2000 [15]. Normal weight was defined as a BMI-for-age below the 85th percentile, overweight as 85th to 95th percentiles, whereas obesity was defined as a BMI-for-age above the 95th percentile. Abdominal obesity was defined using reference tables for Mexican-American children when WC was greater than the 75th percentile according to age and gender [16].

2.3. Biochemical measurements. Blood samples were obtained to determine the levels of serum glucose, total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol, using standard methods for the clinical chemistry system ILab 350 (Instrumentation Laboratory SpA, Spain). Adiponectin and leptin concentrations were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Insulin levels were measured using a chemiluminescence method (Immunolite, France). Insulin resistance was determined with the homeostasis model for insulin resistance (HOMA-IR): [(fasting glucose, mg/dL*Insulin μ U/ml)/405] with a value ≥ 3.3 , which corresponds to the 90th percentile of the HOMA-IR index.

2.4. DNA extraction and CNV analysis. Genomic DNA extraction from peripheral blood was performed using columns with a silica membrane (QIAamp DNA Blood Midi / Kit,

Qiagen, Germany). To determine the CNVs of genes or intergenic regions, we performed real-time PCR with a specific TaqMan assay and the *RNase P* human TaqMan copy number reference [17-25] (Table 1). We selected genes that had been associated with obesity-related phenotypes before, in these we selected regions that are reported in the database of genomic variations (DGV). These regions were used as an approximation of the copy number in the whole gene. The PCR reaction was performed in the 7900HT Fast Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); as quality control, all samples were analyzed in duplicate. Results were analyzed by the CopyCaller Software v.2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to measure the relative copy number of each genome segment in each sample.

2.5. Statistical Analysis. We described the sociodemographic and clinical characteristics and the risk factors, expressed in frequencies for qualitative variables and in medians and interquartile range for quantitative variables. For comparison of frequency or medians between groups, the chi square test or Kruskal Wallis test were used, respectively. To determine the association of BMI, WC, or insulin serum levels with the CNVs studied, ANOVA, correlation analysis, and linear regression models were evaluated, considering an alpha of 0.02 after correction by Bonferroni's method. To define the risk of abdominal obesity, logistic regression models were evaluated. Statistical analysis was performed using STATA software v.11.2.

3. Results

Based on the percentiles of BMI according to age and gender, all the children were classified into three groups: normal weight, overweight, and obese. The prevalence of normal weight was 50.5%, whereas, 21.6% were overweight and 27.9% present were obese. The increase in body weight correlated with low levels of HDL-cholesterol and adiponectin and increased WC and blood pressure were associated with increased levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol, leptin, and insulin, compared with these in normal-weight children. In addition, children with obesity more frequently presented abdominal obesity, Acanthosis nigricans, insulin resistance (IR), and a history of parents or relatives with T2D and/or obesity (Table 2).

We found a negative correlation between BMI and adiponectin levels, as well as between adiponectin and leptin, and adiponectin and insulin, and a positive correlation between BMI with leptin and insulin levels, as well as between the levels of leptin and insulin (Table 3).

The analysis of CNVs in six regions corresponded to five genes previously associated with obesity: *LEPR* (intron 2 and intron 3), *NEGR1*, *ARHGEF4*, *CPXCRI*, and *INS*, and four intergenic regions (1p36.33b, 12q15c, 15q21.1a, and 22q11.21d). For all these CNVs, children more frequently presented 2 copies. We classified the CNVs in three categories: loss (0 or 1 copies), reference group (2 copies), and gain (3 or more copies). We found significant differences in CNV frequency between children with obesity compared with that in normal weight children for 3 of the 6 intragenic regions and 3 of the 4 intergenic regions tested. For *ARHGEF4*, we found that children with obesity more frequently showed gains (22.6%) as also observed for *CPXCRI* (49.2%), whereas for *INS*, losses occurred most frequently in obese children (25.7%). Regarding intergenic regions, it was found that in children with obesity, gains occurred more frequently at the positions 12q15c (43.5%), 15q21.1a (37.9%), and 22q11.21d (38.1%) compared with those in children of normal weight (Figure 1, Table S1). Furthermore, the relationship between serum insulin levels and insulin resistance with CNV was assessed in *INS*. Insulin levels and HOMA-IR index were not significantly different from each other in the three types of CNVs (Figure 2). No significant associations were found between serum levels of total cholesterol, HDL-c, or LDL-c with the CNVs in the genes or intergenic regions analyzed.

We observed that children with gains in intron 3 of *LEPR* showed a decrease in WC, as well as in the case of *NEGR1*, which correlates with a significant decrease in BMI and WC. On the other hand, children with gains in *CPXCRI* and *ARHGEF4* showed a significant increase in BMI. In the case of *INS*, it was observed that children with losses had a significantly greater BMI and WC. Analysis of the intergenic regions showed that the gain in the 12q15c region was associated with increased BMI, the 15q21.1a region with an increase in WC, and the 22q11.21d region with increased BMI and WC (Table 4). Children with gains in *NEGR1*, had a 24% lower risk of abdominal obesity (OR = 0.76; 95%CI: 0.59-0.97), whereas children with gains in *ARHGEF4* and *CPXCRI*, and losses in *INS* presented 1.35 ($p = 0.025$), 1.57 ($p < 0.001$), and 1.63 ($p < 0.001$) times higher risk of

abdominal obesity, respectively, compared with that in children with low copy numbers (0-2). We also observed an association between abdominal obesity with the copy number of intergenic regions: 12q15c (OR = 1.40; 95%CI: 1.13-1.86), 15q21.1a (OR = 1.43; 95%CI: 1.10-1.81), and 22q11.21d (OR = 1.42; 95%CI: 1.14-1.81) (Figure 3).

4. Discussion

Genetic association studies are useful for understanding the pathogenesis of polygenic diseases such as obesity, allowing us to study the simultaneous participation of several genes and genetic variants [26]. Although at least 97 loci are associated with the risk of obesity, many of the identified genes are not known to have any role in the biology of the disease under study and include described associations with genomic regions whose functions are yet unknown. Currently, the participation of CNVs has been proposed to play a role in disease development and progression [3].

Our data show that circulating adiponectin was decreased in obese children with a strongly negative correlation between serum adiponectin and BMI, whereas serum leptin was increased by 3-fold in these children. Leptin resistance appears to be a mechanism contributing to the burden of obesity that extends across multiple organs. Leptin is involved in food intake, body weight, energy expenditure, and neuroendocrine functions. It has also been associated with the percentage of visceral and body fat, BMI, hip circumference, and glucose levels. Several studies have reported that mutations in the genes encoding leptin (*LEP*) and its receptor (*LEPR*) have been associated with hyperphagia and morbid obesity [27, 28]. Jeon *et al.* show that higher copy numbers of the *LEPR* exon 2 may contribute to higher transcriptional activity of *LEPROT* by a gene dosage effect, which may be accordingly responsible for *LEPR* downregulation in T2D patients. In our study, we did not determine whether the presence of CNVs in introns 2 and 3 of *LEPR* affect its expression; we only observed a difference in the copy number in these regions, suggesting that the region of intron 2 is more resistant to the formation of new CNVs by the proposed mechanisms (the unequal meiotic recombination and replication errors) [29]. Although we suggest that the regulatory regions refer to those that may be contained within the studied intergenic regions and may affect the expression of nearby genes, this does not specifically refer to the *LEPR* gene.

In this study, we found significant differences in the copy numbers among children with obesity compared to those in normal weight children for *LEPR*, *NEGR1*, *ARHGEF4*, *CPXCR1*, and *INS* and four intergenic regions previously associated with obese children. Additional significant associations with other obesity-related features such as waist circumference and abdominal obesity consistent with the associations with BMI were also found. Jeon *et al.*, in an analysis of adult Koreans, found that CNVs located in the region of exon 2 of *LEPR* contribute to deregulation of *LEPR*, interrupting its signal, and resulting in an association with increased body weight [29]. We found that the CNVs in intron 2 have no relation with BMI or WC, whereas the CNVs in intron 3 contribute to decreased WC, which could influence gene expression depending on the region where it is located.

Furthermore, *NEGR1* located on chromosome 1p31.1, encodes a protein of the immunoglobulin family with widespread expression in the hypothalamus, hippocampus, and cerebellum, and is involved in the differentiation and maturation of neurons and adipocytes [30]. Variations in this gene have been associated with obesity and insulin resistance [31]. Further, Willer *et al.*, found that an elimination of 45 kb, which removed the conserved elements upstream of this gene, is associated with increased BMI and delayed development [32]. In our study, an increase in the copy number of this gene was associated with decreased BMI (0.67 kg/m²) and WC (2.01 cm); on the other hand, it reduced the risk of abdominal obesity (OR=0.76).

ARHGEF4 is located in 2q21.1c and encodes a guanine nucleotide exchanger involved in the signaling by the proteins Rac and Rho, which are involved in several metabolic processes [33]. The CNVs of this gene are associated with delayed development and neural alterations [34], as well as resistance to insulin [35]. We found that an increase in the CNVs of this gene was associated with increased risk of abdominal obesity (OR=1.35).

CPXCR1 is located in Xq21.3, and this region has been associated with the development of cleft lip and cleft palate [36], though the mechanism by which this disease develops has not been defined. In terms of CNVs, Rocca *et al.* found that this region is associated with the phenotypes of the Klinefelter syndrome (KS) [37], which has a wide range of phenotypes. The common characteristics include small testes and infertility, but

KS subjects are at increased risk of hypogonadism, cognitive dysfunction, obesity, T2D, osteoporosis, and autoimmune disorders [38]. We found that this region contributed to the risk of developing abdominal obesity (OR = 1.57), and increased WC (2.10 cm) and BMI (0.71 kg/m²).

INS is located in 11p15.5 and encodes preinsulin that when processed in proteasomes becomes the active form of insulin and maintains glucose and lipid homeostasis. Polymorphisms in this gene have been associated with the development of MODY diabetes [39], whereas the C109Y mutation is associated with the development of neonatal diabetes [40]. In this study, we found that losses in this gene increased the risk of abdominal obesity (OR = 1.63) and were associated with an increase in BMI (0.77 kg/m²) and WC (2.20 cm). However, these losses were not associated with serum insulin levels, suggesting that these variations may influence protein functionality but not its expression.

In relation to variations in the intergenic regions, little is known about their biological role in the genome. However, it is possible that these regions contain regulatory elements such as enhancers and repressors that modify the expression of nearby genes. The CNVs may exert their effects on the causative gene whose distance can be as far as 1 Mb away [41]. The regions studied are close to *MDM2* (12q15), *LIPC* (15q21.1), and *MAPK1* (22q11.21). *MDM2* encodes an ubiquitin ligase, which marks tumor suppressor proteins such as p53 for proteasomal degradation; its overexpression has been associated with increased susceptibility to tumor formation [42]. *LIPC* encodes a hepatic lipase with hydrolase activity for triglycerides and variants of this gene have been implicated in increased risk of cardiovascular disease [43] and T2D [44]. *MAPK1* (also called p38-MAPK) is a member of the serine/threonine kinase, which acts as an essential component of the MAP kinase signal transduction pathway. Depending on the cellular context, the MAPK/ERK cascade mediates diverse biological functions such as cell growth, adhesion, survival, and differentiation through regulation of transcription, translation, and cytoskeletal rearrangements [45]. Involvement of p38-MAPK has been shown in adipogenesis and hyperglycemia in cell lines, whereas in animal models with a high-fat diet, it has been associated with the development of obesity, hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin intolerance [46].

Bae et al, found three new regions with CNVs (chr15:45994758–45999227, chr22:20722473–21702142, and chr18:3559620–3561217) that were significantly associated with the risk of T2D, particularly, the 15q21.1 region of chr15:45994758–45999227 [9]. We found a significant association between the gain in the copy number in intergenic regions with abdominal obesity and increasing BMI. Our results suggest that the effect of CNVs depends on their location within the genome, which could modify the translation and transcription levels of nearby genes. Thus, CNVs would result in compromised metabolic pathways related to nutrient absorption, leading to the development of obesity in childhood. Experimental studies are needed to confirm or refute this hypothesis.

In this study, 1423 children were included, which allowed the detection of low frequency CNVs, thus strengthening the impact of the study. However, there were a few limitations as well. We only demonstrated the presence of CNVs related to obesity in Mexican children; however, the pathogenic mechanisms by which these CNVs can influence the development of obesity are yet to be determined. The associations observed between CNVs and obesity are specific to our population, and so the knowledge of their genetic structure is of fundamental importance in characterizing the associated genetic variants in greater detail. It should be considered that the frequencies of these genetic variants differ from those in the population where they were originally identified. However, it is necessary to establish suitable designs that take into account the appropriate inclusion criteria for cases and controls, homogeneity, and appropriate sample size based on the prevalence of obesity. Finally, it is necessary to repeat this study in other populations to validate our findings.

5. Conclusions

Our study provides evidence of regions with copy number variations related to obesity, principally abdominal obesity, as well as its effect on BMI in Mexican children, which are important genetic markers. It is important to continue searching for these variations and determine their pathogenic mechanisms to prevent and control obesity, and to consider the genetic differences due to population ancestry.

Conflicts of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) with the grant SALUD-2013-C01-201471 (FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE), by fundación IMSS A.C., and by Fundación Gonzalo Río Arronte I.A.P. During the study, Diana Lizzete Antúnez-Ortiz was a grant recipient of the CONACyT-Mexico. We thank Travis Ashworth for his contribution to the revision of English grammar in the manuscript.

References

- [1] Nielsen LA, Nielsen TR, Holm JC. The Impact of Familial Predisposition to Obesity and Cardiovascular Disease on Childhood Obesity. *Obes Facts*. 2015;8(5):319-28.
- [2] Barquera S, Campos I, Rivera JA. Mexico attempts to tackle obesity: the process, results, push backs and future challenges. *Obes Rev*. 2013;14(Suppl 2):69-78.
- [3] Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, Powell C, Vedantam S, Buchkovich ML, Yang J, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197-206.
- [4] Bradfield JP, Taal HR, Timpson NJ, Scherag A, Lecoeur C, Warrington NM, Hypponen E, Holst C, Valcarcel B, Thiering E, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat Genet*. 2012;44(5):526-531
- [5] Felix JF, Bradfield JP, Monnereau C, van der Valk RJ, Stergiakouli E, Chesi A, Gaillard R, Feenstra B, Thiering E, Kreiner-Møller E, et al. Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index. *Hum Mol Genet*. 2016;25(2):389-403
- [6] Gamazon ER, Stranger BE. The impact of human copy number variation on gene expression. *Brief Funct Genomics*. 2015;14(5):352-7.
- [7] Mullegama SV, Alaimo JT, Chen L, Elsea SH. Phenotypic and molecular convergence of 2q23.1 deletion syndrome with other neurodevelopmental syndromes associated with autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):7627-43.

-
- [8] Lalaria M, Saha P, Potocki L, Bi W, Yan J, Girirajan S, Burns B, Elsea S, Walz K, Chan L, et al. A duplication CNV that conveys traits reciprocal to metabolic syndrome and protects against diet-induced obesity in mice and men. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002713.
- [9] Bae JS, Cheong HS, Kim JH, Park BL, Park TJ, Kim JY, Pasaje CF, Lee JS, Park YJ, Park M, et al. The genetic effect of copy number variations on the risk of type 2 diabetes in a Korean population. *PLoS One.* 2011;6(4):e19091.
- [10] Zhang D, Li Z, Wang H, Yang M, Liang L, Fu J, Wang C, Ling J, Zhang Y, Zhang S, et al. Interactions between obesity-related copy number variants and dietary behaviors in childhood obesity. *Nutrients.* 2015;7(4):3054-66.
- [11] Jarick I, Vogel CI, Scherag S, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A. Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):840-52.
- [12] Yang TL, Guo Y, Shen H, Li J, Glessner JT, Qiu C, Deng FY, Tian Q, Yu P, Liu YZ, et al. Copy number variation on chromosome 10q26.3 for obesity identified by a genome-wide study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(1):E191-5.
- [13] Waalen J. The genetics of human obesity. *Transl Res.* 2014;164(4):293-301.
- [14] Mejía-Benítez MA, Bonnefond A, Yengo L, Huyvaert M, Dechaume A, Peralta-Romero J, Klunder-Klunder M, García-Mena J, El-Sayed-Moustafa JS, Falchi M, et al. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase *AMY1* gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia.* 2015;58(2):290-4.
- [15] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000;320(7244):1240-3.
- [16] Fernandez JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr.* 2004;145(4):439-44.
- [17] Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, Zhang Y, Ye K, Jun G, Hsi-Yang Fritz M, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature.* 2015;526(7571):75-81.

-
- [18] Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BW, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, Friend KL, Baker C, Buono S, Vissers LE, et al. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet.* 2014;46(10):1063-71.
- [19] Park H, Kim JI, Ju YS, Gokcumen O, Mills RE, Kim S, Lee S, Suh D, Hong D, Kang HP, et al. Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing. *Nat Genet.* 2010;42(5):400-5.
- [20] Campbell CD1, Sampas N, Tsalenko A, Sudmant PH, Kidd JM, Malig M, Vu TH, Vives L, Tsang P, Bruhn L, et al. Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):317-32.
- [21] Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46.
- [22] Alkan C, Kidd JM, Marques-Bonet T, Aksay G, Antonacci F, Hormozdiari F, Kitzman JO, Baker C, Malig M, Mutlu O, et al. Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nat Genet.* 2009;41(10):1061-7.
- [23] Ju YS, Hong D, Kim S, Park SS, Kim S, Lee S, Park H, Kim JI, Seo JS. Reference-unbiased copy number variant analysis using CGH microarrays. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):e190.
- [24] Suktitipat B, Naktang C, Mhuantong W, Tularak T, Artiwet P, Pasomsap E, Jongjaroenprasert W, Fuchareon S, Mahasirimongkol S, Chantratita W, et al. Copy number variation in Thai population. *PLoS One.* 2014;9(8):e104355.
- [25] Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, et al. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):91-104.
- [26] Shabana, Hasnain S. Effect of the Common Fat Mass and Obesity Associated Gene Variants on Obesity in Pakistani Population: A Case-Control Study. *Biomed Res Int.* 2015;2015:852920.

-
- [27] Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare genetic forms of obesity: Clinical approach and current treatments in 2016. *Obes Facts*. 2016;9(3):158-73.
- [28] Mariman EC, Bouwman FG, Aller EE, van Baak MA, Wang P. Extreme obesity is associated with variation in genes related to the circadian rhythm of food intake and hypothalamic signaling. *Physiol Genomics*. 2015;47(6):225-31.
- [29] Jeon JP, Shim SM, Nam HY, Ryu GM, Hong EJ, Kim HL, Han BG. Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus. *BMC Genomics*. 2010;11:426.
- [30] Funatsu N, Miyata S, Kumanogoh H, Shigeta M, Hamada K, Endo Y, Sokawa Y, Maekawa S.. Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J Biol Chem*. 1999;274(12):8224-30.
- [31] Fall T, Arnlöv J, Berne C, Ingelsson E. The role of obesity-related genetic loci in insulin sensitivity. *Diabet Med*. 2012 Jul;29(7):e62-6.
- [32] Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SI, Elliott AL, Jackson AU, Lamina C, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 2009;41(1):25-34.
- [33] Thiesen S, Kübart S, Ropers HH, Nothwang HG. Isolation of two novel human RhoGEFs, ARHGEF3 and ARHGEF4, in 3p13-21 and 2q22. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(1):364-9.
- [34] Dharmadhikari AV, Kang SH, Szafranski P, Person RE, Sampath S, Prakash SK, Bader PI, Phillips JA 3rd, Hannig V, Williams M, et al. Small rare recurrent deletions and reciprocal duplications in 2q21.1, including brain-specific ARHGEF4 and GPR148. *Hum Mol Genet*. 2012;21(15):3345-55.
- [35] Irvin MR, Wineinger NE, Rice TK, Pajewski NM, Kabagambe EK, Gu CC, Pankow J, North KE, Wilk JB, Freedman BI, et al. Genome-wide detection of allele specific copy number variation associated with insulin resistance in African Americans from the HyperGEN study. *PLoS One*. 2011;6(8):e24052.
- [36] Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(1):64-72.

-
- [37] Rocca MS, Pecile V, Cleva L, Speltra E, Selice R, Di Mambro A, Foresta C, Ferlin A. The klinefelter syndrome is associated with high recurrence of copy number variations on the X chromosome with a potential role in the clinical phenotype. *Andrology*. 2016;4(2):328-34.
- [38] Aksglaede L, Link K, Giwercman A, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A. 47,XXY Klinefelter syndrome: clinical characteristics and age-specific recommendations for medical management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C(1):55-63.
- [39] Boesgaard TW, Pruhova S, Andersson EA, Cinek O, Obermannova B, Lauenborg J, Damm P, Bergholdt R, Pociot F, Pisinger C, et al. Further evidence that mutations in *INS* can be a rare cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). *BMC Med Genet*. 2010;11:42.
- [40] Bee YM, Zhao Y, Ellard S, Hattersley AT, Yap F. Permanent neonatal diabetes in siblings with novel C109Y *INS* mutation transmitted by an unaffected parent with somatic mosaicism. *Pediatr Diabetes*. 2014;15(4):324-8
- [41] Klopocki E, Mundlos S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2011;12:53-72.
- [42] Liu YC, Hsiao HH, Yang WC, Liu TC, Chang CS, Yang MY, Lin PM, Hsu JF, Lee CP, Lin SF. MDM2 promoter polymorphism and p53 codon 72 polymorphism in chronic myeloid leukemia: the association between MDM2 promoter genotype and disease susceptibility, age of onset, and blast-free survival in chronic phase patients receiving imatinib. *Mol Carcinog*. 2014;53(12):951-9.
- [43] Posadas-Sánchez R, Ocampo-Arcos WA, López-Uribe ÁR, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, León EÁ, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Cardoso-Saldaña G, Medina-Urrutia A, et al. Hepatic lipase (*LIPC*) C-514T gene polymorphism is associated with cardiometabolic parameters and cardiovascular risk factors but not with fatty liver in Mexican population. *Exp Mol Pathol*. 2015;98(1):93-8.
- [44] Ou L, Yao L, Guo Y, Fan S. Association of the G-250A promoter polymorphism in the hepatic lipase gene with the risk of type 2 diabetes mellitus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(1):45-8.

- [45] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75(1):50-83.
- [46] Yu Y, Rajapakse AG², Montani JP³, Yang Z⁴, Ming XF⁵. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in arginase-II-mediated eNOS-uncoupling in obesity. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:113.

TABLE 1: Copy number variants selected in five genes and four intergenic regions

Assay ID	DGV	Chromosome position	Gene	Location	Reference
Hs06530590_cn	esv3586400	Chr1: 72516113 - 72546537	<i>NEGR1</i>	Intron 1	[17]
Hs06585085_cn	nsv830081	Chr1: 65886080 - 66062800	<i>LEPR</i>	Intron 2	[18]
Hs06571926_cn	nsv823109	Chr1: 65923256 - 66024320	<i>LEPR</i>	Intron 3	[19]
Hs02877230_cn	dgv4075n100	Chr2: 131477948 - 132279313	<i>ARHGEF4</i>	Exon 1	[18]
Hs02728909_cn	nsv515219	ChrX: 87893400 - 88151600	<i>CPXCRI</i>	Exon 1	[20]
Hs01116764_cn	dgv1566n54	Chr11: 2176852 - 2181266	<i>INS</i>	Exon 2	[21]
Hs03336984_cn	nsv471522	Chr1: 522139 - 756783	Intergenic	1p36.33b	[22]
Hs06941897_cn	nsv821005	Chr12: 69819095 - 69819779	Intergenic	12q15c	[23]
Hs05382010_cn	esv3892684	Chr15: 45659188 - 46372824	Intergenic	15q21.1a	[24]
Hs04082205_cn	nsv834135	Chr22: 20724378 - 20845563	Intergenic	22q11.21d	[25]

DGV: Database of genomic variants. Assay ID: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/applied-biosystems.html>.

TABLE 2: Anthropometric and clinical characteristics of participating children in the study

Factor	Normal weight 719 (50.5%)	Overweight 308 (21.6%)	Obese 396 (27.9%)	p
Gender n (%)				
Male	378 (52.6)	144 (46.8)	221 (55.8)	0.107 ^a
Female	341 (47.4)	164 (53.3)	175 (44.2)	
Age (years)	9 (7-11)	9 (8-11)	9 (8-11)	0.066 ^b
BMI (kg/m ²)	16.4 (15.2-17.9)	20.3 (18.8-21.7)	24.1 (22-26.8)	<0.001 ^b
Waist circumference (cm)	57.6 (53.7-62.9)	68.1 (62.8-73.9)	78 (72.2-86.2)	<0.001 ^b
Abdominal obesity, n (%)				
No	694 (96.5)	191 (62)	31 (7.8)	<0.001 ^a
Yes	35 (3.5)	117 (38)	365 (92.2)	
SBP (mmHg)	95 (90-100)	100 (90-105)	100.5 (95-110)	<0.001 ^b
DBP (mmHg)	65 (60-70)	69 (60-70)	70 (60-73)	<0.001 ^b
Glucose (mg/dl)	81 (75-87)	82 (77-88)	83 (77-89)	0.007 ^b
Cholesterol (mg/dl)	152 (132-175)	158 (137.5-177)	157.5 (136-181.5)	0.008 ^b
HDL-c (mg/dl)	54 (45-61)	49.5 (41-57.5)	43 (37-52)	<0.001 ^b
LDL-c (mg/dl)	96 (82-114)	104.5 (88-120)	105.5 (89.5-122)	<0.001 ^b
Triglycerides (mg/dl)	70 (55-90)	87.5 (66.5-119.5)	103 (76-147.5)	<0.001 ^b
Adiponectin (µg/ml)	14.5 (12.5-16.4)	14.1 (12.3-16.5)	13.6 (11.8-16.0)	0.009 ^b
Leptin (ng/ml)	10.2 (5.8-17.4)	22.4 (14.8-29.5)	30.9 (22.6-38.4)	<0.001 ^b
Insulin (µU/ml)	4.6 (2.6-7.4)	7.4 (4.3-11)	9.7 (4.8-16.2)	<0.001 ^b
HOMA-IR, n (%)				
< percentile 90	703 (97.7)	289 (93.8)	284 (71.7)	<0.001 ^a
≥ percentile 90	16 (2.3)	19 (6.2)	112 (28.3)	
Acanthosis, n (%)				
No	642 (89.3)	225 (73.1)	148 (37.4)	<0.001 ^a
Yes	77 (10.7)	83 (26.9)	248 (62.6)	
T2D family history, n (%)				
No	655 (91.1)	268 (87)	340 (85.9)	0.017 ^a
Yes	64 (8.9)	40 (13)	56 (14.1)	
Obesity family history, n (%)				
No	390 (54.2)	139 (45.1)	137 (34.6)	<0.001 ^a
Yes	329 (45.8)	169 (54.9)	259 (65.4)	

Data are reported as medians (25th-75th) or as noted in table. ^a Chi-square test; ^b Kruskal Wallis test. BMI: Body mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, HDL-c: High density lipoprotein-cholesterol, LDL-c: Low density lipoprotein-cholesterol, HOMA-IR: Homeostatic model assessment-insulin resistance, T2D: Type 2-diabetes.

TABLE 3: Correlation between serum levels of adiponectin, leptin and insulin with BMI.

Factors	r	p
BMI/Adiponectin	-0.1287	<0.001
BMI/Leptin	0.7112	<0.001
BMI/Insulin	0.4693	<0.001
Adiponectin/Leptin	-0.0803	0.007
Adiponectin/Insulin	-0.1064	<0.001
Leptin/Insulin	0.4145	<0.001

r: Spearman correlation coefficient. BMI: Body mass index.

TABLE 4: Effect of copy number in genes and intergenic regions on body mass index and waist circumference

	Factor	Type	β (95% CI) ^a	P
Gene				
<i>LEPR</i> (Intron 2)	BMI	Gain	-0.26 (-1.51; 0.98)	0.677
	WC		-1.37 (-4.64; 1.91)	0.413
<i>LEPR</i> (Intron 3)	BMI	Gain	-0.50 (-1.01; 0.02)	0.057
	WC		-1.85 (-3.21; -0.49)	0.008
<i>NEGR1</i>	BMI	Gain	-0.64 (-1.10; -0.19)	0.006
	WC		-2.03 (-3.24; -0.83)	0.001
<i>ARHGEF4</i>	BMI	Gain	0.63 (0.11; 1.15)	0.017
	WC		1.45 (0.09; 2.81)	0.037
<i>CPCXR1</i>	BMI	Gain	0.66 (0.21; 1.11)	0.004
	WC		2.10 (0.89; 3.30)	0.001
<i>INS</i>	BMI	Loss	0.77 (0.30;1.25)	0.002
	WC		2.20 (0.94;3.45)	0.001
Intergenic regions				
1p36.33b	BMI	Gain	0.06 (-0.46; 0.57)	0.829
	WC		-0.13 (-1.47; 1.21)	0.852
12q15c	BMI	Gain	0.88 (0.36; 1.41)	0.001
	WC		2.04 (0.65; 3.43)	0.004
15q21.1a	BMI	Gain	0.67 (0.20; 1.14)	0.005
	WC		1.98 (0.75; 3.21)	0.002
22q11.21d	BMI	Gain	1.09 (0.59; 1.59)	<0.0001
	WC		2.61 (1.29; 3.92)	<0.0001

^aLinear regression models adjusted for age, gender and family history of obesity. Children with 2 copies were chosen as the reference group. BMI: Body mass index, WC: Waist circumference.

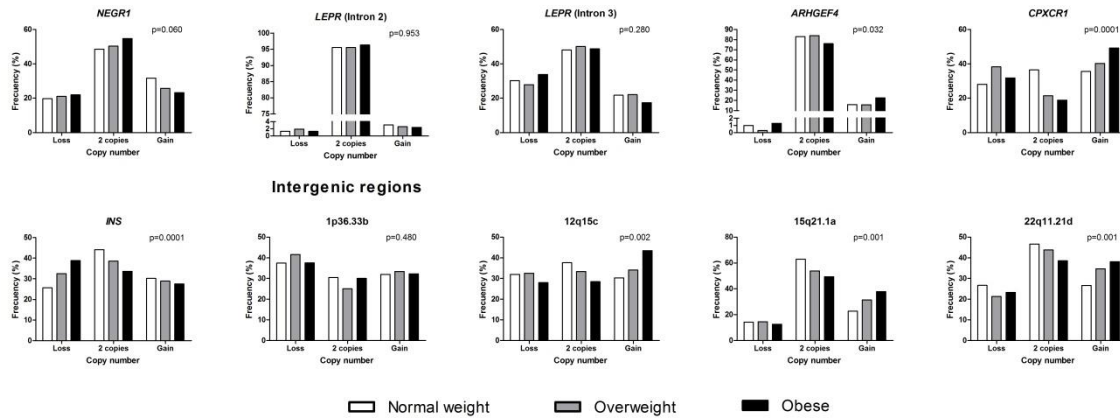


FIGURE 1: Frequency of copy number in studied regions by BMI group. The p value was calculated using the χ^2 test (Table S1).

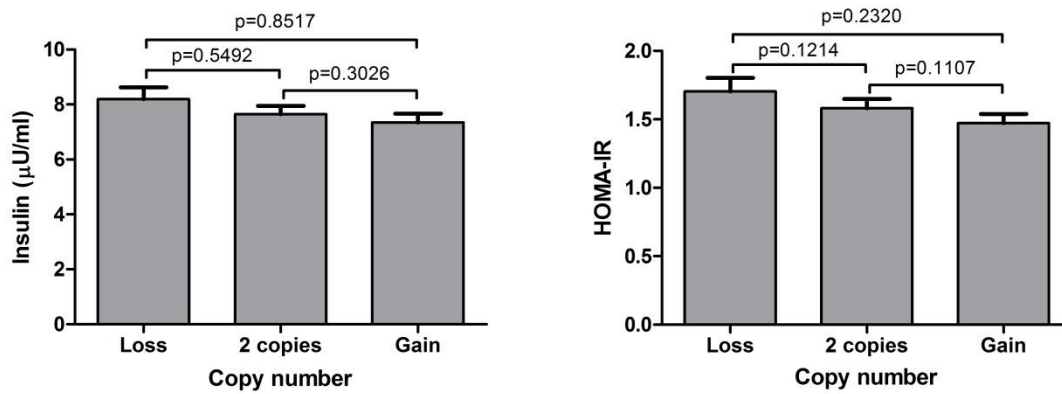


FIGURE 2: Relationship between insulin levels and insulin resistance with CNVs in the *INS* gene. Variance analysis (ANOVA) was performed to determine the relationship between levels of insulin or HOMA-IR index and CNVs. Pair comparisons by test of Bonferroni.

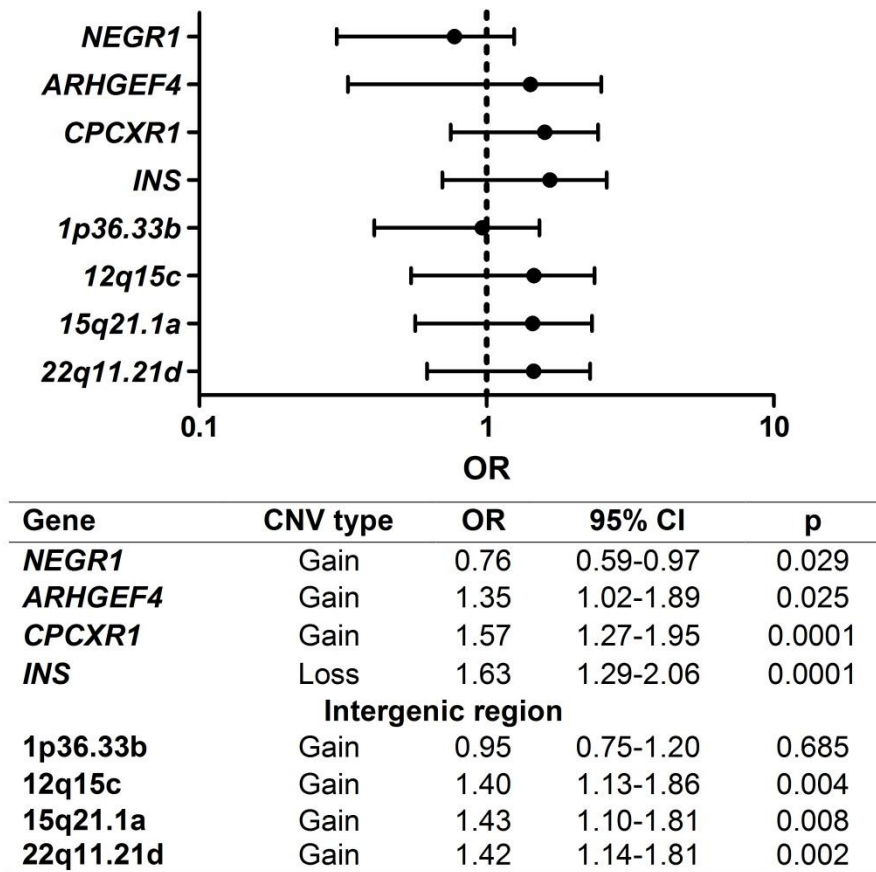


FIGURE 3: Association between the CNVs and abdominal obesity in Mexican children. The forest plot shows the results of the logistic regression models adjusted for age and gender, for the *ARHGEF4*, *NEGR1* and *CPXCR1* and intergenic regions the reference group was defined as individuals with loss copy number (0-2) and compared with the group with the highest copy number (≥ 3), while for the *INS* the reference group was of children with the highest copy number (≥ 2) and compared with the group with loss copy number (0-1).

CAPITULO II: RESULTADOS ADICIONALES

Se determinaron las CNVs en los genes *DCK*, *TCF7L2*, *PNPLA4*, *ZNF718*, *SH2B1*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IL10*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Cuadro V).

Cuadro V. Genes no relacionados con obesidad infantil

Gen	Región	Tipo	Normopeso 719 (50.53%)	Sobrepeso 308 (21.64%)	Obesidad 396 (27.83%)	P
<i>DCK</i>	Exón 1	Pérdida	155 (21.6)	69 (22.4)	85 (21.5)	0.980
		2 copias	277 (38.6)	122 (39.6)	151 (38.2)	
		Ganancia	286 (39.8)	117 (38.0)	159 (40.3)	
<i>TCF7L2</i>	Exón 1	Pérdida	304 (42.4)	138 (45)	165 (42.7)	0.902
		2 copias	234 (32.6)	91 (29.6)	121 (31.4)	
		Ganancia	179 (25)	78 (25.4)	100 (25.9)	
<i>PNPLA4</i>	Exón 8	Pérdida	361 (50.3)	158 (51.3)	200 (50.5)	0.405
		2 copias	132 (18.4)	44 (14.3)	77 (19.4)	
		Ganancia	225 (31.3)	106 (34.4)	119 (30.1)	
<i>ZNF718</i>	ND	Pérdida	258 (35.9)	110 (35.7)	154 (38.9)	0.604
		2 copias	285 (39.6)	114 (37.1)	140 (35.4)	
		Ganancia	176 (24.5)	84 (27.3)	102 (25.8)	
<i>SH2B1</i>	Exón 2	Pérdida	107 (14.9)	55 (18)	73 (18.9)	0.366
		2 copias	526 (73.5)	221 (72.2)	267 (69)	
		Ganancia	83 (11.6)	30 (9.8)	47 (12.1)	
<i>LEP</i>	Exón 3	Pérdida	51 (7.1)	20 (6.5)	39 (9.9)	0.425
		2 copias	624 (86.8)	270 (87.7)	331 (83.5)	
		Ganancia	44 (6.1)	18 (5.8)	26 (6.6)	
<i>ADIPOQ</i>	Intrón 2	Pérdida	160 (22.3)	82 (26.6)	94 (23.7)	0.486
		2 copias	343 (47.7)	148 (48.1)	190 (48)	
		Ganancia	216 (30)	78 (25.3)	112 (28.3)	
<i>IL10</i>	Exón 3	Pérdida	93 (13)	38 (12.5)	54 (13.9)	0.857
		2 copias	551 (76.7)	241 (79)	300 (77.1)	
		Ganancia	74 (10.3)	26 (8.5)	35 (9)	

The data indicate n(%), the p value was calculated using χ^2 test.

Por otro lado se realizó la determinación de los niveles séricos de IL-6 e IL-10, (Cuadro VI), se observa que los niños con sobrepeso y obesidad presentan una

disminución en los valores de IL-10, mientras que en los niveles de IL-6 no hay diferencias significativas.

Cuadro VI. Niveles séricos de IL-6 e IL-10

Factor	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	P*
IL-6 (pg/ml)	21.9 (6.8-102.4)	22.5 (6.3-98.5)	20.8 (7.5-73.5)	0.6812
IL-10 (pg/ml)	91.8 (14.4-469.7)	89.3 (13.9-461.5)	57.9 (2.4-314.8)	0.0367

Los datos indican mediana (p25-p75). *Prueba de Kruskal-Wallis

Se evaluaron modelos de regresión lineal para determinar el efecto del incremento en el IMC sobre los niveles séricos de distintos biomarcadores de inflamación. En el cuadro VII se muestra una disminución significativa de los niveles séricos de adiponectina, en 0.14 $\mu\text{g/ml}$ por cada kg/m^2 de incremento en el IMC, con un incremento en los niveles de insulina (0.85 $\mu\text{U/ml}$ por cada kg/m^2) y de leptina (2.23 ng/ml por cada kg/m^2). También, al evaluar modelos de regresión lineal para determinar la relación entre el número de copias con los niveles séricos de IL-10, adiponectina, leptina e insulina, no encontramos asociaciones significativas (cuadro VIII).

Cuadro VII. Efecto del IMC sobre los niveles séricos de IL-6, IL-10, adiponectina, leptina e insulina

Factor	β (IC95%)*	P
IL-6 (pg/ml)	-1.92 (-3.97; 0.14)	0.067
IL-10 (pg/ml)	-6.63 (-22.74;9.48)	0.420
Adiponectina ($\mu\text{g/ml}$)	-0.11 (-0.13;0.03)	0.001
Leptina (ng/ml)	2.23 (2.11;2.36)	<0.001
Insulina ($\mu\text{U/ml}$)	0.85 (0.76-0.94)	<0.001

*Modelos de regresión lineal ajustados por edad y género

Cuadro VIII. Relación entre el número de copias con los niveles séricos de IL-10, adiponectina, leptina e insulina

Factor	β (IC95%)*	P
IL-10 (pg/ml)	-49.96 (-148.1;28.2)	0.318
Adiponectina (μg/ml)	-0.14 (-0.32;0.04)	0.135
Leptina (ng/ml)	-0.61 (-1.80; 0.58)	0.313
Insulina (μU/ml)	-0.12 (-0.33;0.10)	0.288

*Modelos de regresión lineal ajustados por edad y género

**CAPITULO III: "VARIACIONES DE NÚMERO DE COPIAS: MARCADORES Y
PREDICTORES DE DIABETES TIPO 2"**

Variaciones de número de copias: marcadores y predictores de diabetes tipo 2

Alan Gilberto Ramírez-Valverde,^a Diana Lizzete Antúnez-Ortiz,^a Alberto Méndez-Beleche,^a Eugenia Flores-Alfaro,^b Iván de Jesús Ascencio-Montiel,^c Miguel Cruz^a

Copy number variation: markers and predictors for type 2 diabetes

Type 2 diabetes (T2D) is a disease characterized by a deficiency in production or action of insulin. It is the result mainly of the interaction of the environment, lifestyle, as well as genetic factors. It is considered as one of the major health issues in the world because it affects severely the psychological well-being and overall life quality. Recently it has been shown that DNA copy number variations (CNVs) are associated with several diseases, including obesity and T2D. The CNVs are present from 9 to 18 % of the genome and can modify the expression levels of mRNA and proteins encoded by genes located near their localization. Less is known about their contribution to the pathogenesis of metabolic diseases, which is necessary to characterize so that these variations can be potentially used as biomarkers of genetic risk CNVs of T2D.

Keywords Palabras clave

Type 2 diabetes	Diabetes tipo 2
DNA copy number variation	Variaciones en el número de copia de ADN
Single nucleotide polymorphism	Polimorfismo de un solo nucleótido

La diabetes tipo 2 (DT2) es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Se origina por un defecto en la secreción y/o acción de la insulina.¹ Esta epidemia es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 346 millones de personas con DT2 y ocurren 3.4 millones de muertes por las complicaciones. Se prevé que aumente más del doble para el año 2030,² situación que también representa un problema de salud pública en México.³ La prevalencia del padecimiento se estimó en 14.42 % según la ENSANUT 2006, que representa 7.3 millones de mexicanos mayores de 20 años de edad.⁴ En la ENSANUT 2012 sobre prevalencia de DT2, se demostró un 9.2 % por diagnóstico médico previo, mayor a lo reportado en la encuesta anterior.⁵

La DT2 es una enfermedad multifactorial, con una alta influencia de la genética del individuo. Los factores asociados en la población mexicana son la edad, la escolaridad baja, la coexistencia de enfermedad renal o hipercolesterolemia y la obesidad abdominal.^{6,7} En cuanto a las variaciones genéticas se ha observado que la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés single nucleotide polymorphisms) se asocia a obesidad y a DT2.⁸ A la fecha se han identificado 70 loci asociados con DT2; de esta manera, se ha demostrado un mayor riesgo para el desarrollo de diabetes en portadores de SNP en los genes *FTO* y *MC4R* con una dieta inadecuada,⁹ así como disminución del riesgo para DT2 en portadores de SNP en *TCF7L2* sometidos a intervenciones en el estilo de vida.¹⁰ A pesar de contar con más 70 genes implicados, los casos atribuibles a estos SNP no exceden el 10 % del total de casos de DT2, por lo que se han explorado nuevas posibilidades, como las variaciones en el número de copias (CNV).

^aUnidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal

^bUnidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero

^cCoordinación de Vigilancia Epidemiológica, Unidad de Atención Primaria a la Salud, Dirección de Prestaciones Médicas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal

México

Comunicación con: Miguel Cruz

Teléfono: (55) 5761 2358

Correo electrónico: mcruz@yahoo.com

Recibido: 30/06/2014

Aceptado: 15/07/2014

 **Al índice**
Ramírez-Valverde AG *et al.* Variaciones de número de copias, ADN y DT2

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad caracterizada por una deficiencia en la producción o acción de la insulina; es el resultado de la interacción principalmente de factores ambientales, el estilo de vida, así como factores genéticos. Se considera como uno de los problemas de salud más importantes en el mundo debido a que afecta seriamente la independencia, el bienestar psicológico y en general la calidad de vida. Recientemente se ha demostrado que las variaciones en el número de copias de ADN (CNV, del inglés copy

number variations) se asocian con diferentes enfermedades, entre ellas la obesidad y DT2. Las CNV se presentan en el 9 al 18 % del genoma y pueden modificar los niveles de expresión de mRNA y proteína codificados por genes cercanos a su ubicación. Poco se conoce acerca de su contribución en la patogénesis de las enfermedades metabólicas, por lo cual es necesario caracterizar estas variaciones para que potencialmente sean utilizadas como biomarcadores genéticos de riesgo de DT2.

Resumen**Diversidad genética en la población mexicana**

La población mexicana se caracteriza por un alto grado de diversidad genética. La población está formada de una mezcla de genes nativos amerindios que oscila entre el 49 y el 65 %, de europeos entre 30 y 45.8 % y africanos del este entre 1.8 y 6 %, dependiendo de la región geográfica del país estudiada.¹¹⁻¹⁴ De esta manera, en la actualidad se han demostrado variantes genéticas asociadas a población europea y para población amerindia, entre otras. La medición de la ancestría en estudios genéticos en poblaciones con mezclas étnicas es necesaria, dado que la estratificación constituye un factor de confusión para las asociaciones genéticas.¹⁵ Las diferencias étnicas entre la población mexicana y las poblaciones de origen europeo, en quienes se han realizado la mayor parte de los estudios de asociación genómica (GWAS, por sus siglas en inglés: genome-wide association studies), han evidenciado diferencias en las señales genéticas asociadas a la DT2.¹⁶⁻¹⁸ En el primer GWAS para DT2 realizado en mexicanos se demostró replicación de únicamente cuatro regiones génicas del total de las 46 regiones reportadas en la literatura en el 2011 (*HNFI1A*, *KCNQ1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*).¹⁹ Hasta este momento, se han descrito 18 genes *loci* asociados a DT2 en población mexicana, los cuales han sido obtenidos en su mayoría de estudios comparativos y de casos y controles (cuadro I). Recientemente un metaanálisis de 26 488 casos de DT2 y 83 964 controles de origen europeo, de Asia del este, de Asia del sur, mexicano y mexicanoamericano demostró siete *loci* asociados a diabetes, independientemente de su ancestría (*TMEM154*, *SSRI-RREB1*, *FAF1*, *POU5F1-TCF19*, *LPP*, *ARL15*, *MPHOSPH9*).¹⁶

Variantes de número de copia en el genoma

El genoma humano varía como resultado de los cambios en su secuencia y estructura. Las variaciones en la

secuencia comprenden a los SNP y a pequeñas inserciones y eliminaciones (deleciones) de unos pocos nucleótidos. La variación estructural comprende las CNV y las aneuploidías cromosómicas.³⁷ Mediante el análisis completo del genoma y al utilizar arreglos basados en hibridación genómica comparativa y otros tipos de tecnologías de escaneo del genoma se han identificado y clasificado las CNV de acuerdo con su tamaño. Típicamente los fragmentos de ADN son mayores a 1 kb, cuya diferencia en número de copias se evidencia al comparar con dos o más genomas,³⁸ y comprenden inserciones, eliminaciones, traslocaciones e inversiones del material genómico.³⁹ Se considera que al menos el 12 % del genoma humano contiene CNV.⁴⁰ Estos son comunes entre los individuos sanos; de hecho, dos personas serán diferentes en el número de copias alrededor del 0.78 % de sus genomas.⁴¹ Inicialmente, las CNV fueron identificadas durante los estudios específicos de *locus*⁴² o durante el análisis de las familias de genes.⁴³ La identificación de las CNV a través de todo el genoma puede realizarse mediante secuenciación o bien mediante microarreglos. El uso de los microarreglos ha sido el instrumento más utilizado que ha permitido avanzar en el conocimiento de las CNV.⁴⁴ Actualmente se ha determinado que las CNV pueden afectar la variación fenotípica humana y contribuir a la proclividad a enfermedades tales como el autismo,⁴⁵ la psoriasis,⁴⁶ la esquizofrenia,⁴⁷ la obesidad⁴⁸ y la enfermedad de Crohn.⁴⁹

Impacto funcional de las CNV

Las CNV presentes en los genes pueden influenciar los niveles de expresión tanto del ARNm como la proteína. Se estima que entre 9 y 18 % de la variación heredable puede estar asociada con el número de copias.⁵⁰ Además es posible que las CNV afecten directa o indirectamente la expresión de genes vecinos, por ejemplo,

Cuadro I Loci asociados con diabetes tipo 2 (DT2) en población mexicana

Autor, año	Gen/Locus	Nombre del gen	Localización	Asociación
Ortega-Pierres, 2007 ²⁰	<i>ACE</i>	Enzima convertidora de angiotensina I	17q23.3	Nefropatía diabética
Santos, 2002 ²¹	<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	19q13.2	Edema macular
Del Bosque-Plata, 2004 ²²	<i>CAPN10</i>	Calpaina 10	2q37.3	Diabetes tipo 2
Gamboa-Meléndez, 2012 ²³	<i>CDK-N2AIPNL</i>	Proteína N-terminal de interacción CDKN2A	5q31.1	Diabetes tipo 2
	<i>CDKN2A</i>	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa 2A	9p21	Diabetes tipo 2
Quiroz-Mercado, 2002 ²⁴	<i>HLADR7</i>	HLA-DR7	6p21.3	Retinopatía diabética
Pérez-Luque, 2003 ²⁵	<i>HLADB1</i>	HLADB1	6p21.3	Diabetes tipo 2 y enfermedad renal terminal
Weissglas-Volkov, 2006 ²⁶	<i>HNF1A</i>	HNF1 homebox A	12q24.2	Diabetes tipo 2 y niveles de lípidos
Martínez-Gómez, 2011 ²⁷	<i>IRS1</i>	Sustrato 1 de receptor de insulina	2q36	Diabetes tipo 2
Long, 2012 ²⁸	<i>IGF2BP2</i>	Proteína de unión a ARNm del factor de crecimiento similar a insulina	3q27.2	Diabetes tipo 2
Valladares-Salgado, 2010 ²⁹	<i>LTBP1</i>	Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta 1 latente	2p22-p21	Nefropatía diabética
Gutiérrez-Vidal, 2011 ³⁰	<i>LOC387761</i>	LOC387761	11p12	Diabetes tipo 2
Cameron, 2007 ³¹	<i>MGEA5</i>	Antígeno 5 de expresión en meningioma	10q24.1-q24.3	Diabetes tipo 2
Campbell, 2012 ³²	<i>KCNQ1</i>	Miembro 1 de la subfamilia KQT de canales de K voltaje-dependiente	11p15.5	Diabetes tipo 2
Williams, 2014 ³³	<i>SLC16A11</i>	Miembro 11 de la familia de acarreadores de solutos 16	17p13.1	Diabetes tipo 2
Huertas-Vázquez, 2008 ³⁴	<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción 7 similar a 2	10q25.3	Diabetes tipo 2 y niveles de triglicéridos
Pérez-Luque, 2012 ³⁵	<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral	6p21.3	Diabetes tipo 2
Duggirala, 1999 ³⁶	<i>10q</i>	---	10q	Diabetes tipo 2

la eliminación de regiones reguladoras (como aumentadores) disminuye la expresión del gen blanco y la cantidad de proteína producida. Por otro lado, la pérdida de regiones exónicas produce isoformas de la proteína que frecuentemente no es funcional.⁵¹ Otra explicación alternativa para la modificación observada en los niveles relativos de expresión de genes mapeados cerca de CNV sobre los cambios de su número de copias se basa en la evidencia reciente de la transcripción de todo el genoma.⁵² Estudios recientes revelan que múltiples regiones transcripcionalmente activas se asocian para formar una gran variedad de transcritos en un *locus* dado con más de la mitad, las cuales son transcripciones alternativas no codificantes de genes codificadores de proteínas. Del mismo modo, los genes utilizan el promotor de los genes vecinos en células y etapas de desarrollo específicas.⁵³

Se ha descrito la aparición de la transcripción inducida de quimeras, mediante la cual los exones en tándem son transcritos en una sola molécula de ARNm, que parece ser generalizada y que afecta a más de la mitad de los *loci* investigados (figura 1).⁵⁴

Estos genes podrían tener varias regiones reguladoras alternativas, independientes de promotores, y con frecuencia se superponen sus límites con los de otros genes, además de que es posible que se modifique el nivel relativo de expresión de esta unidad de transcripción.⁵⁵

Antecedentes científicos: CNV y DT2

Se cuenta con pocos estudios que evalúan la asociación entre las CNV y la DT2 (cuadro II).

En 2010, Jeon *et al.* encontraron una asociación entre DT2 y el número de copias < 2 en el gen *LEPR* (razón de momios [RM] 1.92) en 137 casos y 258 controles de origen coreano.⁵⁹ En estudios conducidos en población asiática y publicados en 2011, Kudo *et al.* reportaron la asociación entre eliminación de la región 4p16.3 y la DT2 de inicio temprano en 100 casos y 100 controles de origen japoneses;⁶⁰ en tanto Bae *et al.*, en un estudio de 275 casos y 496 controles de origen coreano, reportaron tres regiones asociadas (15q21.1,

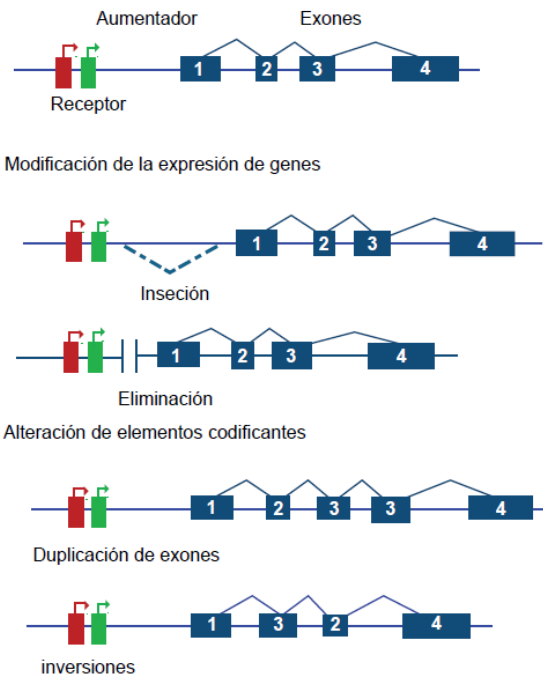


22q11.22 y 22q11.22) a DT2.⁶¹ En un estudio publicado en *Nature* en 2010, se encontró una asociación entre la región de número variable CNVR5583.1 (rs1798090), localizada en el gen de tetraspanina 8 (*TSPAN8*) 12q14.1 y la DT2, demostrada en 2000 casos de DT2 y 3000 controles.⁶² De manera similar, utilizando las muestras de pacientes genotipificadas con el microarreglo Affymetrix Mapping 500K, Chen *et al.* identificaron tres regiones asociadas a la DT2 (1p34.3, rs16824514; 1q41, rs337147; y 19q13.2, rs2016070) utilizando una nueva estrategia de análisis de asociaciones de CNV en GWAS.⁶³ En un estudio publicado en 2011 por Grassi *et al.* se encontró asociación entre la retinopatía diabética severa y la región CNVR6685.1 de 28.5 Mb, localizada en el intrón del gen *CCDC101* ($p = 3.4 \times 10^{-6}$) en el cromosoma 16p11.2. El estudio incluyó 281 sujetos con retinopatía diabética y 1856 controles.⁶⁴ En 2011 Irvin *et al.* publicaron un estudio realizado en 1040 afroamericanos sin diabetes para buscar la asociación entre los niveles de insulina y la resistencia a la insulina (medida por el HOMA-IR) con las CNV. Para los niveles de insulina se asociaron dos regiones (rs10277702 y rs361367 del gen *TCRVB*; rs12552047 en cromosoma 9), mientras que para la resistencia a la insulina los cuatro marcadores (rs10277702 y rs361367 del gen *TCRVB*; rs13003829 del gen *ARHGEF4*; y rs12509348 del gen *DCK*). Así, las asociaciones más significativas se dieron con el gen *TCRVB*.⁶⁵ En 2012, Plengvidhya *et al.* condujeron un estudio de casos y controles en 305 pacientes con DT2 y 250 controles del Hospital Siriraj, de Bangkok, Tailandia, para buscar CNV en la región del gen *CAPN10*. No se encontraron diferencias en la presencia de duplicaciones o eliminaciones entre casos y controles (3.9 frente a 2.9, 1.3 frente a 0.3, $p = 0.692$); sin embargo, la inserción/eliminación (in/del) 19 se encontró asociada con la DT2 en el modelo recesivo (RM: 0.66, IC 95 %: 0.47-0.94, $p = 0.022$).⁶⁶ Recientemente en un estudio realizado en 1677 sujetos mexicanoamericanos en San Antonio, Texas, se estudió la heredabilidad de 2937 CNV detectadas mediante los algoritmos PennCNV y QuantiSNP; se encontraron regiones con bajas frecuencias (0.2 %) y 765 previamente no reportadas.⁶⁷

Conclusiones y perspectivas

La diabetes es una enfermedad metabólica multifactorial con grado variable de predisposición hereditaria y que se origina principalmente por la exposición a factores ambientales. La enfermedad se caracteriza por hiperglucemia persistente debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo cual afecta el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y gra-

Figura 1 Influencia de las CNV en el genoma



La presencia de las CNV afecta la expresión del gen a nivel del mRNA y de la proteína: a) La presencia de inserciones o eliminaciones a nivel de regiones reguladoras de la transcripción (aumentador y represor) impiden la interacción de estas con el promotor del gen, lo que lleva a una disminución de su expresión. b) La duplicación de exones y la inversión de regiones codificantes lleva a la producción de proteínas quiméricas (modificado de Hurles *et al.*, 2008⁵⁶).

Los datos epidemiológicos indican que el riesgo de padecer esta enfermedad es más alto en poblaciones de origen amerindio que en poblaciones de origen europeo. Además, existe evidencia que indica que hay factores genéticos de riesgo implicados en dichas diferencias de prevalencia. México es de los países con mayor ocurrencia de DT2 a nivel mundial y esto está relacionado con las diferencias genéticas de la población mexicana, aunadas a la exposición ambiental. Diversos estudios se han enfocado en conocer las variaciones genómicas que contribuyen a la proclividad a la enfermedad. De esta manera se han caracterizado los SNP y las CNV como factores que contribuyen a la diversidad genética entre individuos. Las CNV son variantes en el genoma de tamaño mayor a 1 kb; se encuentran en aproximadamente del 9 al 18 % del genoma y afectan a genes cercanos y modifican su expresión a nivel del ARNm y de la proteína. Esta variabilidad representa la base para

Cuadro II Antecedentes científicos de estudios de las CNV y diabetes tipo 2

Autor, Año	N (casos/controles)	Población	Microarreglo	Hallazgos
Shfir, 2009 ⁵⁷	407 (194 213)	Caucásica	Affymetrix 500K	No asociación
Wang, 2009 ⁵⁸	256 (128 128)	Africana/caucásico-americana	PCR	No asociación con región 1q
Jeon, 2010 ⁵⁹	395 (137 258)	Coreana	Affymetrix 50K	Delección Gen LEPR
Kudo, 2011 ⁶⁰	200 (100 100)	Japonesa	deCODE-Illumina CNV 370K Bead Chip	Región 4p16.3
Bae, 2011 ⁶¹	771 (275 496)	Coreana	Illumina HumanHap 300 BeadChip	Regiones 15q21.1, 22q11.22 y 22q11.22
Craddock, 2010 ⁶²	5000 (2000 3000)	Caucásica	Agilent CGH, Nimble-Gen CGH, Illumina iSelect	Región 12q14.1, CNVR5583.1(rs 1798090) el gen TSPAN8
Chen, 2010 ⁶³	5000 (2000 3000)	Caucásica	Affymetrix 500K	1p34.3 (gen INPP5B), 1q41, gen MOSC2 y 19q13.2
Grassi, 2011 ⁶⁴	2137 (281 1856)	Caucásica	Affymetrix 5.0	Retinopatía diabética y CNVR6685, 1 gen CCDC 101
Irvin, 2011 ⁶⁵	1040	Africana-Americana (sin diabetes)	Affymetrix 6.0	Asociación gen TCRVB y resistencia a la insulina
Plengvidhya, 2012 ⁶⁶	555 (305 250)	Tailandesa	PCR multiple	No asociación CNVs-DT2 en gen CAPN10
Blackburn, 2013 ⁶⁷	1677	Mexicoamericana	Illumina Infinium Beadchip	765 CNVs previamente no reportados

CNV = variación en el número de copias

diferentes características fenotípicas asociadas con las CNV. A pesar de su importancia, las CNV han sido poco estudiadas, por lo cual es importante continuar analizándolas para determinar su tamaño y ubicación y, de esta manera, conocer su contribución a la fisiopatología de la enfermedad. Las CNV afectan regiones importantes del genoma, las cuales están implicadas en diversas vías de señalización y son metabólicas, por lo que la comprensión de sus mecanismos de acción es requisito previo para considerar posibles estrategias

pronósticas, preventivas y de tratamiento para la DT2, no sin reiterar el papel de las modificaciones al estilo de vida como el principal esfuerzo para el control de esta patología

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

- World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva. Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. WHO/NCD/NCS/99.2 Disponible en http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who_ncd_ncs_99.2.pdf. [Último acceso 15 de marzo de 2014.]
- Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Datos Fundamentales. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>. [Último acceso 10 de marzo de 2014.]
- Hunt KJ, Gonzalez ME, Lopez R, Haffner SM, Stern MP, Gonzalez-Villalpando C. Diabetes is more lethal in Mexicans and Mexican-Americans compared to Non-Hispanic whites. *Annals of epidemiology*. 2011;21:899-906.
- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B *et al.* Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex*. 2010;52 Suppl 1, S19-26.
- Gutierrez J, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L *et al.* Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. Instituto Nacional de Salud Publica, Cuernavaca.
- Schulze MB, Hoffmann K, Boeing H, Linseisen J, Rohrmann S, Mhlig M *et al.* An accurate risk score based on anthropometric, dietary, and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:510-5.
- Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World journal of diabetes*. 2013;4:114-23.
- Murea M, Ma L, Freedman BI. Genetic and environ-



- mental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. The review of diabetic studies. *Rev Diabet Stud.* 2012;9:6-22.
9. Ortega-Azorin C, Sorli JV, Asensio EM, Coltell O, Martínez-González MA, Salas-Salvado J, *et al.* Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovascular diabetology.* 2012;11:137.
 10. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, *et al.* TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *The New England Journal of Medicine.* 2006;355:241-50.
 11. McCarthy MI, Zeggini E. Genome-wide association studies in type 2 diabetes. *Current diabetes reports,* 2009;9:164-71.
 12. Galanter JM, Fernández-López JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernández-Rozadilla C, Via M, *et al.* Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS genetics.* 2012;8:e1002554.
 13. Martínez-Fierro ML, Beuten J, Leach RJ, Parra EJ, Cruz-López M, Rangel-Villalobos H, *et al.* Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. *Journal of Human Genetics.* 2009;54:504-9.
 14. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernández-López JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, *et al.* Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106, 8611-6.
 15. Salazar-Flores J, Dondiego-Aldape R, Rubi-Castellanos R, Anaya-Palafox M, Nuno-Arana I, Canseco-Avila LM, *et al.* Population structure and paternal admixture landscape on present-day Mexican-Mestizos revealed by Y-STR haplotypes. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council.* 2010;22:401-9.
 16. (2014). Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nature genetics.* 46, 234-44.
 17. Krithika S, Valladares-Salgado A, Peralta J, Escobedo-de La Peña J, Kumate-Rodríguez J, Cruz M, *et al.* Evaluation of the imputation performance of the program IMPUTE in an admixed sample from Mexico City using several model designs. *BMC Medical Genomics.* 2012;5:12.
 18. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Compan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García 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;57:509-13.
 19. Parra EJ, Below JE, Krithika S, Valladares A, Barta JL, Cox NJ, *et al.* Genome-wide association study of type 2 diabetes in a sample from Mexico City and a meta-analysis of a Mexican-American sample from Starr County, Texas. *Diabetologia.* 2011;54:2038-46.
 20. Ortega-Pierres LE, Gómez García A, Rodríguez Ayala E, Figueroa-Núñez B, Fariás-Rodríguez VM, Higuera-Mendoza AE, *et al.* [Angiotensin-1 converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism in a Mexican population with diabetic nephropathy]. *Medicina Clínica.* 2007;129:6-10.
 21. Santos A, Salguero ML, Gurrola C, Muñoz F, Roig-Melo E, Panduro A. The epsilon4 allele of apolipoprotein E gene is a potential risk factor for the severity of macular edema in type 2 diabetic Mexican patients. *Ophthalmic Genetics.* 2002;23:13-19.
 22. Del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Rodríguez-Torres M, Aurrón-Gómez M *et al.* Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2004;81:122-6.
 23. Gamboa-Melendez MA, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macias H, Vázquez-Cardenas P, Ordóñez-Sánchez ML, Rodríguez-Guillén R, *et al.* Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes.* 2012;61:3314-21.
 24. Quiroz-Mercado H, Suárez-Licona A, Fromow-Guerra J, López-Carasa G, Cardenas-Hernandez R, Ruiz-Morales JA, *et al.* Human lymphocyte antigen DR7 protects against proliferative retinopathy with type II diabetes mellitus. *Archives of Medical Research.* 2002;33:123-7.
 25. Pérez-Luque E, Alaez C, Malacara JM, Garay ME, Fajardo ME, Nava LE, *et al.* Protective effect of DRB1 locus against type 2 diabetes mellitus in Mexican Mestizos. *Human Immunology.* 2003;64:110-8.
 26. Weissglas-Volkov D, Huertas-Vázquez A, Suvolahti E, Lee J, Plaisier C, Canizales-Quinteros S, *et al.* Common hepatic nuclear factor-4alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2006;55:1970-7.
 27. Martínez-Gómez LE, Cruz M, Martínez-Nava GA, Madrid-Marina V, Parra E, García-Mena J, *et al.* A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Annals of Human Genetics.* 2011;75:612-20.
 28. Long J, Edwards T, Signorello LB, Cai Q, Zheng W, Shu XO, *et al.* Evaluation of genome-wide association study-identified type 2 diabetes loci in African Americans. *American Journal of Epidemiology.* 2012;176:995-1001.
 29. Valladares-Salgado A, Angeles-Martínez J, Rosas M, García-Mena J, Utrera-Barillas D, Gómez-Díaz R, *et al.* Association of polymorphisms within the transforming growth factor-beta1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Nephrology (Carlton, Vic).* 2010;15:644-8.
 30. Gutiérrez-Vidal R, Rodríguez-Trejo A, Canizales-Quinteros S, Herrera-Cornejo M, Granados-Silvestre MA, Montufar-Robles I, *et al.* LOC387761 polymorphism is associated with type 2 diabetes in the Mexican population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers.* 2011;15:79-83.
 31. Cameron EA, Martínez-Marignac VL, Chan A, Valladares A, Simmonds LV, Wachter N, *et al.* MGEA5-

- 14 polymorphism and type 2 diabetes in Mexico City. *American Journal of Human Biology. The Official Journal of the Human Biology Council.* 2007;19:593-6.
32. Campbell DD, Parra MV, Duque C, Gallego N, Franco L, Tandon A, et al. Amerind ancestry, socioeconomic status and the genetics of type 2 diabetes in a Colombian population. *PLoS One.* 2012;7:e33570.
 33. Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macias H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Marquez-Luna C, et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature.* 2014;506:97-101.
 34. Huertas-Vazquez A, Plaisier C, Weissglas-Volkov D, Sinshheimer J, Canizales-Quinteros S, Cruz-Bautista I, et al. TCF7L2 is associated with high serum triacylglycerol and differentially expressed in adipose tissue in families with familial combined hyperlipidaemia. *Diabetologia.* 2008;51:62-9.
 35. Perez-Luque E, Malacara JM, Garay-Sevilla ME, Fajardo ME. Association of the TNF-alpha -308G/A polymorphism with family history of type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Clinical Biochemistry.* 2012;45:12-5.
 36. Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, et al. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *American Journal of Human Genetics.* 1999;64:1127-40.
 37. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics.* 2006;7:85-97.
 38. Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2010;12:e8.
 39. Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2007;3:1787-99.
 40. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444:444-54.
 41. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010; 464:704-12.
 42. Barber JC, Joyce CA, Collinson MN, Nicholson JC, Willatt LR, Dyson HM, et al. Duplication of 8p23.1: a cytogenetic anomaly with no established clinical significance. *Journal of Medical Genetics.* 1998;35:491-6.
 43. Trask BJ, Friedman C, Martin-Gallardo A, Rowen L, Akinbami C, Blankenship J, et al. Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 1998;7:13-26.
 44. Zhang X, Du R, Li S, Zhang F, Jin L, Wang H. Evaluation of copy number variation detection for a SNP array platform. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:50.
 45. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007;316:445-9.
 46. Huffmeier U, Bergboer JG, Becker T, Armour JA, Traupe H, Estivill X, et al. Replication of LCE3C-LCE3B CNV as a risk factor for psoriasis and analysis of interaction with other genetic risk factors. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2010;130:979-84.
 47. McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet.* 2009;41:1223-7.
 48. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature.* 2010;463:666-70.
 49. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:1107-12.
 50. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science.* 2007;315:848-53.
 51. Reymond A, Henrichsen CN, Harewood L, Merla G. Side effects of genome structural changes. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2007;17:381-6.
 52. Deneud F, Kapranov P, Ucla C, Frankish A, Castelo R, Drenkow J, et al. Prominent use of distal 5' transcription start sites and discovery of a large number of additional exons in ENCODE regions. *Genome Research.* 2007;17:746-59.
 53. Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biology.* 2006;4:e138.
 54. Parra G, Reymond A, Dabbouseh N, Dermitzakis ET, Castelo R, Thomson TM, et al. Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. *Genome Research.* 2006;16:37-44.
 55. Perry GH. The evolutionary significance of copy number variation in the human genome. *Cytogenetic and Genome Research.* 2008;123:283-7.
 56. Hurles ME, Dermitzakis ET, Tyler-Smith C. The functional impact of structural variation in humans. *Trends in Genetics.* 2008;24:238-45.
 57. Shtir C, Pique-Regi R, Siegmund K, Morrison J, Schumacher F, Marjoram P. Copy number variation in the Framingham Heart Study. *BMC Proceedings.* 2009;3 Suppl 7:S133.
 58. Wang H, Hays NP, Das SK, Craig RL, Chu WS, Sharma N. Phenotypic and molecular evaluation of a chromosome 1q region with linkage and association to type 2 diabetes in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1401-8.
 59. Jeon JP, Shim SM, Nam HY, Ryu GM, Hong EJ, Kim HL, et al. Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus. *BMC Genomics.* 2010;11:426.
 60. Kudo H, Emi M, Ishigaki Y, Tsunoda U, Hinokio Y, Ishii



- M, *et al.* Frequent loss of genome gap region in 4p16.3 subtelomere in early-onset type 2 diabetes mellitus. *Experimental Diabetes Research*. 2011: 498460.
61. Bae JS, Cheong HS, Kim JH, Park BL, Park TJ, Kim JY, *et al.* The genetic effect of copy number variations on the risk of type 2 diabetes in a Korean population. *PLoS One*. 2011;6:e19091.
 62. Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, *et al.* Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2010;464:713-20.
 63. Chen X, Li X, Wang P, Liu Y, Zhang Z, Zhao G, *et al.* Novel association strategy with copy number variation for identifying new risk Loci of human diseases. *PLoS One*. 2010;5:e12185.
 64. Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, Below JE, Cox NJ, Nicolae DL. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Human Molecular Genetics*. 2011;20:2472-81.
 65. Irvin MR, Wineinger NE, Rice TK, Pajewski NM, Kabagambe EK, Gu CC, *et al.* Genome-wide detection of allele specific copy number variation associated with insulin resistance in African Americans from the HyperGEN study. *PLoS One*. 2011;6: e24052.
 66. Plengvidhya N, Chanprasert K, Tangjittipokin W, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT. Identification of copy number variation of CAPN10 in Thais with type 2 diabetes by multiplex PCR and denaturing high performance liquid chromatography (DH-PLC). *Gene*. 2012;506:383-6.
 67. Blackburn A, Goring HH, Dean A, Carless MA, Dyer T, Kumar S, *et al.* Utilizing extended pedigree information for discovery and confirmation of copy number variable regions among Mexican Americans. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21:404-9.

V. DISCUSIÓN

En los últimos años se han publicado múltiples trabajos que demuestran el papel de los genes y su relación con la obesidad (Locke *et al.*, 2015, Felix *et al.*, 2016), los estudios se han enfocado a conocer los factores que contribuyen a la diversidad genética entre individuos, así mismo se ha demostrado la importancia de estas variantes y su contribución a la susceptibilidad al desarrollo de esta enfermedad (Bauer *et al.*, 2009, Thorleifsson *et al.*, 2009, Zhao *et al.*, 2009, Speliotes *et al.*, 2010). Actualmente se conoce que aproximadamente el 12% del genoma contiene CNVs y que estas pueden afectar la expresión de genes cercanos y de esta manera provocar cambios fenotípicos importantes (Redon *et al.*, 2006), sin embargo poco se sabe acerca de la presencia de CNVs en el genoma de la población mexicana.

En nuestro trabajo analizamos cinco genes y cuatro regiones intergénicas que contribuyen al riesgo de obesidad, encontramos que las duplicaciones en los genes *LEPR* y *NEGR1* se asocian con la disminución del IMC, de la circunferencia de cintura (CC) y el riesgo de obesidad abdominal (OA); mientras que las duplicaciones del gen *ARHGEF4*, *CPXCR1* y las regiones intergénicas 12q15c, 15q21.1a y 22q11.21d se relacionan con un aumento significativo en el IMC, CC y del riesgo a OA. Por otro lado, las eliminaciones en el gen *INS* contribuyen al aumento del IMC, de la CC y del riesgo a OA. Estos genes parecen tener una función importante en la maduración de los adipocitos, por lo cual pueden estar directamente relacionados con la acumulación de tejido adiposo, lo que contribuye al desarrollo de la obesidad, sin embargo esta función aún no está bien caracterizada por lo cual se requiere de estudios adicionales que demuestren el papel que desempeñan estos genes, proteínas y vías que están afectadas por la formación de las CNV y la comprensión de sus mecanismos de acción, para una mejor comprensión, predicción y manejo de esta enfermedad.

Diversos estudios han demostrado que en la obesidad existe un estado de inflamación crónica debido a cambios en la composición celular del tejido adiposo,

incluyendo alteraciones en el número, fenotipo y localización de células inmunes y vasculares (Lumeng and Saltiel, 2011, Ouchi *et al.*, 2011). La medición de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en niños obesos ha demostrado que niveles elevados de leptina e IL-6, así como la disminución en los niveles de adiponectina, pueden estar relacionados con disfunción endotelial (Mi *et al.*, 2010, Mirza *et al.*, 2011). Nosotros encontramos que los niveles séricos de leptina e insulina están incrementados tanto en los niños con sobrepeso como en los obesos, además estos tienen niveles disminuidos de adiponectina en comparación con los niños con peso normal. La resistencia a insulina fue mayor en los niños con sobrepeso y obesidad que en los individuos con peso normal.

En el análisis de regresión lineal observamos que existe una relación positiva entre el incremento en el IMC con los niveles séricos de insulina y leptina, y una relación negativa con los niveles de adiponectina, resultados similares a los obtenidos por Chang *et al.*, en niños taiwaneses (Chang *et al.*, 2015) y por Boodai *et al.*, en niños de Kuwait (Boodai *et al.*, 2014). El conjunto de estos resultados sugiere que el aumento en el peso corporal se relaciona con la hipertrofia del tejido adiposo, lo que lleva a la sobreproducción de marcadores proinflamatorios que pueden funcionar como predictores tempranos para el desarrollo de la obesidad y comorbilidades asociadas como resistencia a insulina.

VI. REFERENCIAS

- Bae, J. S., Cheong, H. S., Kim, J. H., Park, B. L., Park, T. J., Kim, J. Y., *et al.* (2011). The genetic effect of copy number variations on the risk of type 2 diabetes in a Korean population. *PLoS One*, 6, e19091.
- Barber, J. C., Joyce, C. A., Collinson, M. N., Nicholson, J. C., Willatt, L. R., Dyson, H. M., *et al.* (1998). Duplication of 8p23.1: a cytogenetic anomaly with no established clinical significance. *J Med Genet*, 35, 491-6.
- Bauer, F., Elbers, C. C., Adan, R. A., Loos, R. J., Onland-Moret, N. C., Grobbee, D. E., *et al.* (2009). Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr*, 90, 951-9.
- Boodai, S. A., Cherry, L. M., Sattar, N. A. & Reilly, J. J. (2014). Prevalence of cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in obese Kuwaiti adolescents. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7, 505-11.
- Bradfield, J. P., Taal, H. R., Timpson, N. J., Scherag, A., Lecoeur, C., Warrington, N. M., *et al.* (2012). A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat Genet*, 44, 526-31.
- Cesari, M., Pahor, M. & Incalzi, R. A. (2010). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*, 28, e72-91.
- Cole, T. J., Bellizzi, M. C., Flegal, K. M. & Dietz, W. H. (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*, 320, 1240-3.
- Conrad, D. F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., *et al.* (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464, 704-12.
- Chang, C. J., Jian, D. Y., Lin, M. W., Zhao, J. Z., Ho, L. T. & Juan, C. C. (2015). Evidence in obese children: contribution of hyperlipidemia, obesity-inflammation, and insulin sensitivity. *PLoS One*, 10, e0125935.
- Felix, J. F., Bradfield, J. P., Monnereau, C., van der Valk, R. J., Stergiakouli, E., Chesi, A., *et al.* (2016). Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index. *Hum Mol Genet*, 25, 389-403.
- Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7, 85-97.
- Gutierrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernandez, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martinez, M. & Hernandez-Avila, M. (2012). Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. *Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca*.
- Hernandez-Avila, M., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gomez-Acosta, L. M., Gaona-Pineda, E., *et al.* (2016). Encuesta nacional de salud y nutrición 2016: Informe final de resultados. *Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca*.

- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91.
- Hussain, S. S. & Bloom, S. R. (2011). The pharmacological treatment and management of obesity. *Postgrad Med*, 123, 34-44.
- Ichihara, S. & Yamada, Y. (2008). Genetic factors for human obesity. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1086-98.
- Irvin, M. R., Wineinger, N. E., Rice, T. K., Pajewski, N. M., Kabagambe, E. K., Gu, C. C. (2011). Genome-wide detection of allele specific copy number variation associated with insulin resistance in African Americans from the HyperGEN study. *PLoS One*, 6, e24052.
- Jeon, J. P., Shim, S. M., Nam, H. Y., Ryu, G. M., Hong, E. J., Kim, H. L. & Han, B. G. (2010). Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus. *BMC Genomics*, 11, 426.
- Korbel, J. O., Kim, P. M., Chen, X., Urban, A. E., Weissman, S., Snyder, M. & Gerstein, M. B. (2008). The current excitement about copy-number variation: how it relates to gene duplications and protein families. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 366-74.
- Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., et al. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, 518, 197-206.
- Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, 121, 2111-7.
- Matsuzawa, Y. (2010). Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86, 131-41.
- Mejia-Benitez, M. A., Bonnefond, A., Yengo, L., Huyvaert, M., Dechaume, A., Peralta-Romero, J., et al. (2015). Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia*, 58, 290-4.
- Mi, J., Munkonda, M. N., Li, M., Zhang, M. X., Zhao, X. Y., Fouejeu, P. C. & Cianflone, K. (2010). Adiponectin and leptin metabolic biomarkers in chinese children and adolescents. *J Obes*, 2010, 892081.
- Mirza, S., Qu, H. Q., Li, Q., Martinez, P. J., Rentfro, A. R., McCormick, J. B. & Fisher-Hoch, S. P. (2011). Adiponectin/leptin ratio and metabolic syndrome in a Mexican American population. *Clin Invest Med*, 34, E290.
- Misra, A. & Khurana, L. (2008). Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, S9-30.
- Mitchell, N. S., Catenacci, V. A., Wyatt, H. R. & Hill, J. O. (2011). Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am*, 34, 717-32.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 85-97.
- Parra, G., Reymond, A., Dabbouseh, N., Dermitzakis, E. T., Castelo, R., Thomson, et al. (2006). Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. *Genome Res*, 16, 37-44.
- Perry, G. H. (2008). The evolutionary significance of copy number variation in the human genome. *Cytogenet Genome Res*, 123, 283-7.

-
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., *et al.* (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-54.
- Reymond, A., Henrichsen, C. N., Harewood, L. & Merla, G. (2007). Side effects of genome structural changes. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 381-6.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., *et al.* (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*, 42, 937-48.
- Tchoukalova, Y. D., Koutsari, C., Karpyak, M. V., Votruba, S. B., Wendland, E. & Jensen, M. D. (2008). Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr*, 87, 56-63.
- Thorleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Steinthorsdottir, V., Sulem, P., Helgadottir, A., *et al.* (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet*, 41, 18-24.
- Trask, B. J., Friedman, C., Martin-Gallardo, A., Rowen, L., Akinbami, C., Blankenship, J., *et al.* (1998). Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet*, 7, 13-26.
- Wells, J. C. (2012). Obesity as malnutrition: the role of capitalism in the obesity global epidemic. *Am J Hum Biol*, 24, 261-76.
- Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., *et al.* (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*, 41, 25-34.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.
- Zhao, J., Bradfield, J. P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C. E., *et al.* (2009). The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 2254-7.