



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Medicina Genómica

**“Asociación de polimorfismos en genes que participan en la vía
de señalización Wnt/ β -Catenina con el riesgo de presentar
obesidad en pacientes mexicanos”**

Tesis que para optar por el grado de

Maestro en Ciencias presenta:

Q.F.B. Diana Karen Mendiola Soto

Tutora

Yolanda Saldaña Álvarez

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Comité tutor:

Lorena Sofía Orozco Orozco

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Haydeé Rosas Vargas

Centro Médico Nacional Siglo XXI

CDMX, Julio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora la Dra. Yolanda Saldaña por darme una formación científica y apoyarme a lo largo del proceso de la maestría, además de integrarme al equipo de trabajo del laboratorio para así incrementar el conocimiento acerca del tema desarrollado en esta tesis. De igual manera agradezco a la M. en C. Guadalupe Salas, por su apoyo, dedicación y paciencia, ya que fue quien fungió como mi asesora a lo largo de la maestría y contribuyó de manera muy importante en mi formación científica y me ha dado todas las herramientas para poder desarrollarme en el ámbito científico y de la investigación. Infinitas gracias por todo durante la realización de mi tesis y todo lo que esto conllevó.

Agradezco a la Dra. Lorena Orozco por haberme permitido realizar mi proyecto de investigación en los laboratorios del INMEGEN; además de agradecer también a los Hospitales del ISSSTE por proveer las muestras estudiadas y así ayudarme a realizar mis experimentos.



Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)SSa., bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
Obesidad.....	1
Bases Fisiológicas de la Obesidad.....	1
Epidemiología de la obesidad.....	3
Genética y obesidad.....	3
Estudios de Asociación.....	4
Adipogénesis.....	7
Vía de señalización canónica o Wnt- β -catenina.....	9
Componentes y mecanismo.....	9
Wnt- β -catenina y adipogénesis.....	11
Antecedentes directos.....	13
Microarreglo ilumina.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	15
Objetivos Particulares.....	15
HIPÓTESIS.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Estudio de asociación caso-control.....	16
Tipo de estudio.....	16
Población de estudio.....	16
Diseño y tamaño de la muestra.....	16
Criterios de inclusión.....	17
Criterios de exclusión.....	17
Selección de polimorfismos.....	17
Genotipificación de SNPs.....	18
Discriminación alélica por el método fluorescente de 5'	
exonucleasa.....	18
Diseño estadístico.....	18
RESULTADOS.....	19
Población de estudio.....	19
Genotipificación.....	20
Estudio de asociación de polimorfismos de los genes LRP5, LRP6 y	
WNT10B con obesidad.....	20
Gen LRP5.....	21
Gen LRP6.....	26
Gen WNT10B.....	28
Análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR).....	29
Comparación entre las frecuencias observadas en este estudio con las reportadas	
en las poblaciones continentales.....	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estrategia de selección de variantes incluidas en el estudio.....	14
Tabla 2. Características clínicas de la población de estudio.....	20
Tabla 3. Frecuencias genotípicas de las variantes analizadas en los genes <i>LRP5</i> , <i>LRP6</i> y <i>WNT10B</i>	21
Tabla 4. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i>	21
Tabla 5. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i> estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.....	22
Tabla 6. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i> estratificando a la población por género y gravedad de la enfermedad.....	23
Tabla 7. Regresión logística de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i>	23
Tabla 8. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i>	24
Tabla 9. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i>	25
Tabla 10. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen <i>LRP5</i> estratificando a la población por género.....	25
Tabla 11. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i>	26
Tabla 12. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i> estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.....	26
Tabla 13. Regresión logística de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i>	27
Tabla 14. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i>	27
Tabla 15. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i>	28
Tabla 16. Asociación alélica y genotípica del SNP analizado del gen <i>WNT10B</i> estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.....	29
Tabla 17. Regresión logística del SNP analizado del gen <i>WNT10B</i>	29
Tabla 18. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen <i>LRP6</i>	29
Tabla 19. Mejor modelo candidato estimado por reducción de dimensionalidad multifactorial.....	30
Tabla 20. Comparación de las frecuencias alélicas de las variantes analizadas con lo reportado en 1000 Genomas.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación fisiológica del balance energético.....	2
Figura 2. Estudio de Asociación entre casos y controles.....	6
Figura 3. Señalización de la vía Wnt/ β -Catenina.....	10
Figura 4. Regulación de la adipogénesis a través de la vía Wnt.....	12
Figura 5. Análisis de desequilibrio de ligamiento para las variantes analizadas del gen <i>LRP5</i>	25
Figura 6. Análisis de desequilibrio de ligamiento para las variantes analizadas del gen <i>LRP6</i>	28
Figura 7. Gráfico de interacción por reducción de dimensionalidad multifactorial, de las variantes; rs2302685, rs2075241, rs4988300, rs312009, rs3736228 y rs833840.....	30

INTRODUCCIÓN

Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, que se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud ⁽¹⁾. Biológicamente, esta entidad obedece a diferentes desordenes relacionados entre sí, en donde existe principalmente un incremento del índice de masa corporal (IMC), como consecuencia de la expansión y acumulación de tejido adiposo; que conduce a un curso clínico con una respuesta inmune constante, que se identifica como inflamación sub-clínica crónica de grado bajo, caracterizada por una desregulación de proteínas denominadas adipocinas. Esta patología se considera una enfermedad compleja o multifactorial causada por la interacción aditiva de múltiples genes en la cual además intervienen factores ambientales.

El parámetro más utilizado para el diagnóstico clínico de sobrepeso y obesidad en adultos avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el IMC; el cual se define como una relación entre el peso y la talla (Kg/m^2) de un individuo. De acuerdo con este parámetro se ha establecido que el IMC ideal oscila entre 20 y 25 Kg/m^2 ; para el sobrepeso, el rango es un IMC de 25-29.9 Kg/m^2 y para la obesidad un IMC igual o mayor a 30 Kg/m^2 . Donde de acuerdo al grado de obesidad, esta se clasifica en: obesidad grado I de 30-34.9 Kg/m^2 , obesidad grado II de 35.0 a 39.9 Kg/m^2 , y cuando es un IMC mayor de 40.0 Kg/m^2 se considera como una obesidad mórbida o grado III ^(1,2,3).

Bases Fisiológicas de la Obesidad

La obesidad es causada por un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, el cual es regulado por un complejo sistema fisiológico que requiere la integración de varias señales periféricas a una regulación central en el cerebro. El hipotálamo funciona como un centro regulador del sistema nervioso central (SNC), el cual recibe información del balance de energía a través de señales neuronales y hormonales a núcleos de diversos tejidos, donde el núcleo arcuato tiene un papel esencial en este sistema. Este contiene dos grupos de neuronas; uno que produce la proteína relacionada con agouti (AGRP) y el

neuropéptido Y (NPY) y otro que produce la propio-melanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART). Donde el primer grupo denominado orexigénico promueve la ingesta de alimentos y reduce el gasto energético, mientras que el segundo denominado anorexigénico tiene un efecto contrario ⁽⁴⁾ (Figura 1).

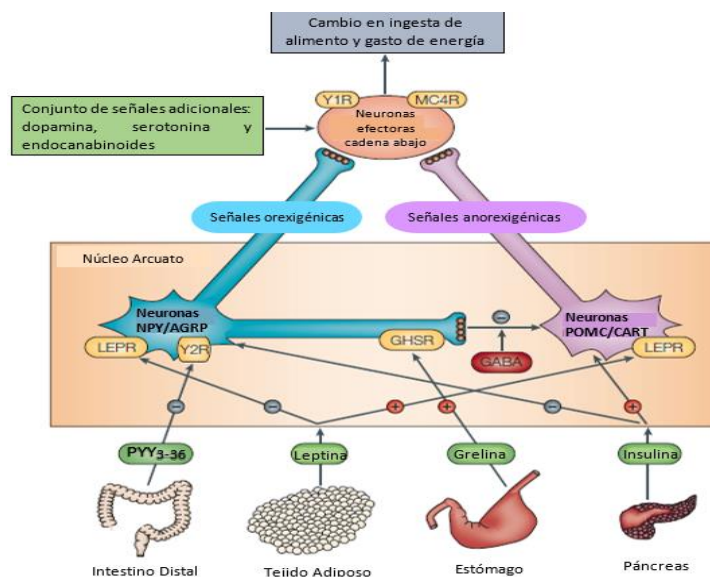


Figura 1. Regulación fisiológica del balance energético. (Modificado de Christopher G. Bell et al., 2005)

La hormona anorexigénica llamada leptina, parece ser el principal indicador de adiposidad y una señal del estado nutricional del organismo, ya que sus niveles en plasma se encuentran altamente relacionados con el número de adipocitos y el contenido de grasa. La insulina es también una hormona que funciona como una señal del nivel de adiposidad en el SNC en un periodo de tiempo de moderado a largo y tiene un efecto anorexigénico ya que estimula las neuronas de POMC/CART e inhibe las neuronas de AGRP/NPY ⁽⁵⁾.

Por otro lado, el péptido Grelina secretado principalmente por el estómago y el duodeno, muestra un incremento en los niveles séricos antes de comer y una disminución después de la ingesta de alimentos. Otro mediador de este proceso es el péptido YY3-36 (PYY3-36), el cual es secretado por el intestino en presencia de comida, presentando su máxima concentración una hora después de dicha ingesta de alimento. La saciedad se encuentra mediada por la respuesta a otros

factores, como lo son; la distensión intestinal y la liberación del péptido colecistoquinina (CCK) ⁽⁶⁾.

Epidemiología de la obesidad

La obesidad es considerada una pandemia, debido a la gran cantidad de individuos que esta afecta alrededor del mundo; la OMS reportó en el 2014 que como mínimo, 2.8 millones de personas mueren a causa de la obesidad o sobrepeso.

En cuanto a México, los reportes muestran un aumento en la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad de un 15.2%, en adultos, del 2000 al 2012; y al realizar la comparación entre las prevalencias del año 2012 (71.2%, IC95% 70.5-72.1) y el 2016 (72.5%, IC95% 70.8-74.3) no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en la ENSANUT 2016 se documentó un incremento de 5.4% en la prevalencia de obesidad para el grupo de mujeres de 20 a 49 años de edad del 2012 al 2016 ⁽⁷⁾.

Genética y obesidad

Estudios en familias, de gemelos y de adopción; han estimado que de la variabilidad en rasgos relacionados con obesidad de un 40% a un 70% se debe a factores genéticos ^(8,9).

Con base en la contribución de los factores genéticos la obesidad puede ser clasificada en: a) obesidad monogénica, la cual es muy rara, muy grave y generalmente se presenta desde la niñez. Dentro de esta clasificación se encuentran los síndromes de obesidad genética, la obesidad por alteración de las vías de la leptina y melanocortina y otros tipos de obesidad monogénica en donde se incluyen tipos raros de obesidad ^(10,11). b) obesidad sindrómica, ésta entidad es una de las manifestaciones clínicas de algún síndrome mendeliano; tiene una incidencia muy baja y c) obesidad multifactorial, la cual se desarrolla como consecuencia de la interacción de múltiples genes de susceptibilidad cuya expresión está influenciada por factores ambientales, este tipo de obesidad es la

más común, puede manifestarse en la infancia o en la adultez y presenta una expresividad muy variable ⁽¹¹⁾.

En 1962, Neel ⁽¹²⁾ postuló la teoría del genotipo “ahorrador”, refiriéndose de esta manera a la eficiencia excepcional en la ingesta y/o utilización del alimento, en la que propone, que como consecuencia de los periodos de gran escasez en los cuales el *homo sapiens* vivió durante un largo periodo, éste desarrolló estrategias de sobrevivencia, como la capacidad biológica evolutivamente de atesorar reservas calóricas (como grasa) para superar los períodos de escasez. Así, en la actualidad el exceso en el consumo de calorías aunado al genotipo ahorrador que se desarrolló y el sedentarismo prevalente, han hecho de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la obesidad, una pandemia. En este contexto, se supone que genes que proveían de una ventaja selectiva a poblaciones que frecuentemente padecían de hambruna ⁽¹²⁾, determinan una mayor predisposición a “ahorrar” energía. Así se ha propuesto que, en la actualidad, individuos que poseen este fenotipo ahorrador en un ambiente obesogénico, serán más susceptibles a incrementar su IMC ⁽¹³⁾.

Estudios de Asociación

La publicación de los resultados del Proyecto del Genoma Humano ⁽¹⁴⁾ en febrero del 2001, arrojó una avalancha de conocimientos sobre la fisiopatología de diversas enfermedades, entre ellas, la obesidad. El conocimiento generado, conjuntamente con el desarrollo de tecnología de vanguardia, así como la capacidad de análisis de datos a gran escala, permitieron establecer que las diferencias fenotípicas entre los individuos resultan de variaciones en aproximadamente el 0.1% del genoma. Entre las bases de datos, de variaciones genéticas, publicadas posteriores a la publicación del Proyecto del Genoma Humano, se encuentra el Proyecto Internacional HapMap publicado en el 2003 ⁽¹⁵⁾ que tuvo como objetivo determinar los patrones comunes de variación en el genoma humano incluyendo poblaciones con ascendencia de África, Asia y Europa. Posteriormente, en 2010 fueron publicados los resultados de la fase piloto del Proyecto de 1000 Genomas, cuyo objetivo fue la caracterización más profunda de las variantes genéticas del genoma humano, mediante secuenciación de alto

rendimiento para posteriormente establecer una correlación entre un genotipo y un fenotipo ⁽¹⁶⁾.

Conforme la tecnología y la capacidad de análisis de datos continuaron mejorando, en 2016 se logró publicar por parte del Consorcio de Agregación del Exoma (ExAC, del inglés Exome Aggregation Consortium), un análisis de variaciones genéticas en las regiones codificantes para proteínas en 60,706 individuos de diversas ancestrías. Hasta la fecha, sin duda este análisis proporciona la base de datos más grande para la estimación de la frecuencia de alelos para las variantes genéticas que codifican para proteínas, generando un filtro para la detección de variaciones asociadas a enfermedades mendelianas graves ^(17,18).

El conocimiento sobre los genes que confieren susceptibilidad a desarrollar obesidad se ha derivado principalmente de estudios de ligamiento, estudios de asociación en genes candidatos y de análisis amplio del genoma (Figura 2) ⁽¹⁹⁾.

El abordaje genómico de esta patología se ha visto favorecido por el desarrollo de tecnologías novedosas capaces de analizar a gran escala variaciones genéticas asociadas con la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Dichas variaciones genéticas se encuentran como polimorfismos genéticos, que se puede definir como la ocurrencia de dos o más alelos de un locus en una frecuencia mayor al 1% en la población. Existen varios tipos de variaciones genéticas; inserciones o deleciones simples que pueden afectar un solo tramo de secuencia de DNA y que pueden variar desde dos, hasta cientos de pares de bases de longitud, variaciones estructurales que se producen en una secuencia de DNA más grande e incluyen tanto a la variación del número de copias (CNVs), eventos de reorganización cromosómica (inserciones, deleciones, inversiones y duplicaciones), así como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés single nucleotide polymorphisms), que se refieren a la sustitución de una sola base del DNA, ya sea una transición que implica el intercambio de bases nitrogenadas puricas (adenina / guanina) o pirimidinicas (citosina / timina); o una transversión que es el intercambio de una base purica por pirimidinica o viceversa, los cuales pueden ser silenciosos o pueden afectar la función de una proteína. Los SNPs, son la fuente más común de variación genética en el ser humano y se estima que en

promedio existe un SNP cada 1,000 a 2,000 nucleótidos, el último reporte afirma que en el genoma humano existen casi 40 millones ⁽¹⁶⁾. La mayoría de estos marcadores son bialélicos, muy estables (tienen una baja tasa de mutación recurrente) y es posible su genotipificación a gran escala en aparatos automatizados ⁽¹⁷⁾. A la fecha, un gran número de polimorfismos y genes involucrados en la homeostasis de la energía han sido analizados en múltiples estudios en diferentes poblaciones. Dentro de estos genes se han identificado principalmente los implicados en: a) control de la ingesta de alimentos, b) gasto energético, c) metabolismo de lípidos y carbohidratos y d) adipogénesis. De hecho, proyectos como el mapa genético de la obesidad muestran loci putativos en todos los cromosomas excepto en el cromosoma Y. Se han descrito prácticamente cientos de loci asociados con fenotipos relacionados con obesidad, dentro de los cuales se han identificado más de 30 genes que presentan asociación con esta patología y que han mostrado reproducibilidad en al menos cinco poblaciones ^(20,21). Esto ha hecho evidente que el número y la importancia relativa del componente genético pueden variar entre los diferentes grupos étnicos y que estas diferencias genéticas junto con el medio ambiente, pueden ser las determinantes en las variaciones de la gravedad y prevalencia de la enfermedad.

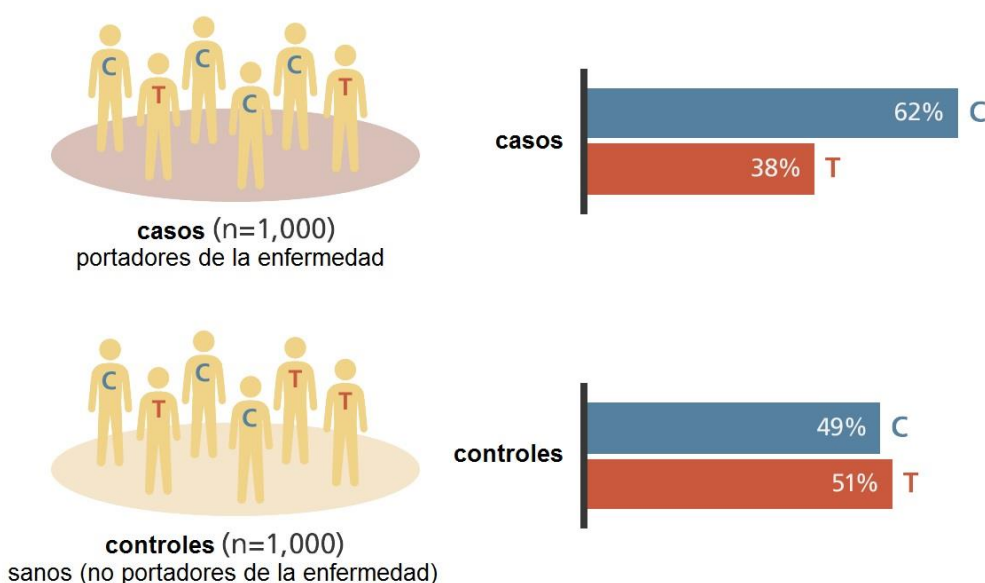


Figura 2. Estudio de asociación entre casos y controles. En la figura se ejemplifica tanto casos, como controles para una enfermedad y el porcentaje del polimorfismo en cada grupo.

A pesar de que los estudios de asociación de polimorfismos en diferentes genes con enfermedades complejas, como la obesidad, han permitido comprender la influencia de los factores genéticos en el desarrollo y gravedad de dichas enfermedades, se ha demostrado que solo explican una pequeña fracción de la etiología de la enfermedad debido a que se ignora la relación entre las enfermedades complejas y los múltiples genes involucrados y las interacciones entre estos ⁽²²⁾.

Con el fin de detectar y caracterizar interacciones gen-gen y gen-ambiente en estudios de casos y controles, se desarrolló un método de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR), que mediante un programa bioinformático permite que los genotipos multilocus se agrupen en grupos de alto y bajo riesgo, reduciendo de manera efectiva los genotipos de predicción de n dimensiones a una dimensión. La nueva variable unidimensional de genotipo multilocus se evalúa por su capacidad para clasificar y predecir el estado de la enfermedad mediante pruebas de validación cruzada y permutación. El método MDR es libre de modelo, en el sentido de que no asume ningún modelo genético en particular, y no es paramétrico, en el sentido de que no estima ningún parámetro ⁽²³⁾.

Adipogénesis

La obesidad resulta de la acumulación excesiva de tejido adiposo la cual va acompañada de hipertrofia e hiperplasia del mismo. La hipertrofia del tejido adiposo es el incremento en el tamaño de los adipocitos, mientras que la hiperplasia es el incremento en el número de los mismos, ésta última se observa más frecuentemente en la obesidad severa ⁽²⁴⁾. Existen tres diferentes tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés, white adipose tissue) el cual representa la mayor cantidad de tejido adiposo en la mayoría de los mamíferos, incluyendo los adultos humanos. Éste se considera un órgano endocrino de homeostasis y almacenamiento de energía que secreta numerosas citocinas (adipocinas) tales como leptina, adiponectina, TNF- α y resistina, que influyen en la ingesta de alimentos, la resistencia a la insulina, la aterosclerosis y que ejercen funciones inmunes y metabólicas. El tejido adiposo

marrón (BAT, por sus siglas en inglés, brown adipose tissue) es responsable principalmente de la termogénesis, donde la proteína desacoplante 1 (UCP-1), tiene una gran capacidad de generación de calor a partir de la grasa marrón que es crucial en los bebés posnatales y en una variedad de mamíferos que hibernan. Estudios recientes han revelado que los depósitos de BAT pueden estar presentes en las regiones torácica y supraclavicular de los adultos humanos. El tercer tipo de tejido, es el conformado por los adipocitos beige que parece ser un tipo diferente de célula termogénica, que al igual que los adipocitos marrón parecen tener la capacidad de suprimir la obesidad a través del incremento de gasto energético, con un patrón de expresión génica distinto al de los adipocitos blancos o marrones, pero con características de ambos tipos de células ⁽²⁵⁾. En presencia de obesidad se han observado alteraciones en el balance entre la secreción de adipocinas, que pueden conducir a enfermedades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial sistémica (HAS), dislipidemias e infarto del miocardio (IM) ⁽²⁶⁾.

A lo largo de la vida, en el tejido adiposo existen células madre precursoras multipotenciales, que al experimentar un reclutamiento excesivo pueden diferenciarse en adipocitos ⁽²⁴⁾. El adipocito se origina de un precursor mesenquimático multipotencial que se diferencia primero a adipoblasto, luego a preadipocito y finalmente a adipocito. En el proceso de adipogénesis intervienen factores transcripcionales como las familias de proteínas C/EBP (del inglés CCAAT/enhancer binding proteins) y PPAR (del inglés peroxisome proliferator-activated receptor). Otras proteínas involucradas son el factor de diferenciación ADD1 quién conjuntamente con SREBP1, inducen la expresión de ácido graso sintasa y de la lipoproteína lipasa, enzimas claves para la provisión y síntesis adipocitaria de ácidos grasos.

Las proteínas de la familia C/EBP (α , β y δ), son factores que se unen a regiones de DNA que regulan la proliferación celular. De hecho, en presencia de glucocorticoides y de insulina, la sobreexpresión del C/EBP α es suficiente para inducir la diferenciación adipocitaria. Después de este evento, las células experimentan la fase de diferenciación terminal, caracterizada por la producción

de gotas de lípidos y la expresión de los sistemas metabólicos propios de los adipocitos maduros ⁽²⁷⁾.

Se ha documentado que, en la obesidad, una vez establecida una adipogénesis alterada, puede desencadenar alteraciones metabólicas sistémicas, las cuales presentan una mejoría en los parámetros metabólicos cuando los pacientes tienen pérdida del tejido adiposo. Estas observaciones apoyan fuertemente que el proceso de la adipogénesis tiene una participación muy importante en el desarrollo de la obesidad y patologías asociadas ⁽²⁸⁾.

Vía de señalización canónica o Wnt- β -catenina

La familia Wnt en humanos, está compuesta de un grupo de 19 glicoproteínas conservadas evolutivamente, que se unen a los receptores Frizzled (Fz) y a proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad 5/6 (LRP5/6), evento que estabiliza a la β -catenina y que inicia una compleja cascada de señalización involucrada en la regulación de la proliferación celular y la polaridad, además de determinar el destino de una célula durante el desarrollo embrionario a través de una serie de vías de transducción de señales ⁽²⁹⁾. Aunado a lo anterior, es importante mencionar, que la vía de señalización WNT, también modifica el destino de las células madre mesenquimales pluripotenciales, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en múltiples tipos celulares incluyendo; adipocitos, miocitos, condrocitos y osteoblastos ⁽³⁰⁾.

Componentes y mecanismo

La señalización, que se activa mediante la familia de glicoproteínas Wnt secretadas, es uno de los mecanismos fundamentales que dirigen la proliferación celular, la polaridad celular, la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular ⁽³¹⁾.

Las WNTs ejercen su efecto a través de múltiples vías de señalización llamadas “canónicas” y “no-canónicas” ⁽³²⁾.

La vía de señalización WNT canónica, converge en el regulador transcripcional β -catenina ⁽³¹⁾. En ausencia de WNTs, la β -catenina citoplásmica es reclutada a un complejo de degradación formado por las proteínas Axina y adenopoliposis de

colon (APC), que facilita su fosforilación secuencial por la caseína cinasa I y glicógeno sintasa quinasa 3-b (GSK3b). Esto permite el inicio de la ubiquitinación y degradación proteosomal de la β -catenina. La unión de WNT al receptor frizzled (FZD) y a los co-receptores, proteínas relacionadas al receptor de LDL 5 y 6 (LRP5/6) lleva a la inactivación del complejo de degradación. Esto resulta en la hipofosforilación de la β -catenina y su translocación al núcleo donde ésta se une a factor promotor de unión linfoide/factor de transcripción específico de células T (LEF/TCF); familia de factores de transcripción para la activación de genes blanco de WNT ⁽³²⁾ (Figura 3).

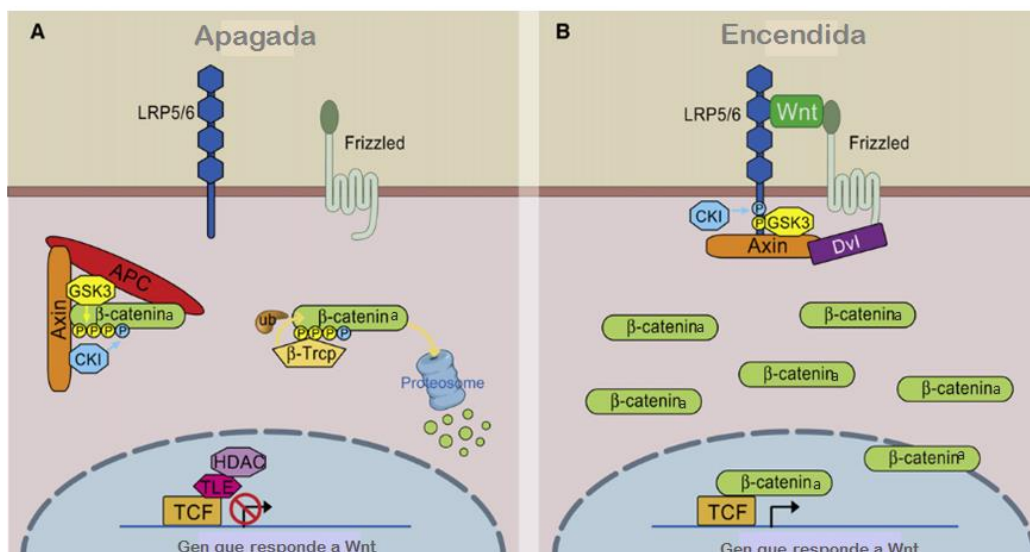


Figura 3. Señalización de la vía Wnt/β-Catenina. (Modificado de Mac Donald et al., 2009).

El descubrimiento de que la disrupción de la señalización Wnt/β-catenina lleva a una adipogénesis espontánea indica que las WNT's endógenas restringen la diferenciación de los preadipocitos. Wnt10b parece ser un candidato para esta señal anti-adipogénica de WNT; ya que su expresión es muy alta en los preadipocitos y disminuye rápidamente después de la inducción de la diferenciación ^(33,34).

Por otro lado, la expresión adiposa específica de Wnt10b protege de obesidad genética debida a deficiencia de leptina y expresión ectópica de AGRP ⁽³⁵⁾.

Wnt- β -catenina y adipogénesis

De manera más reciente, se ha reportado que variantes comunes en los genes de la vía de señalización Wnt- β -catenina, se asocian con la masa ósea así como con la distribución de grasa corporal, lo cual ha mostrado una asociación con el riesgo a presentar enfermedad cardiovascular y como un factor predictivo para el desarrollo de diabetes tipo 2. Por otro lado, también se ha documentado que mutaciones en los genes *LRP5* y *LRP6*, que codifican para proteínas clave en la vía Wnt- β -catenina, relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad también involucradas en esta vía de señalización, las cuales participan en la unión de WNT con los receptores de superficie celular, se asocian de manera similar con el desarrollo del tejido esquelético así como con trastornos cardiometabólicos ⁽³⁶⁾. Además, se ha establecido que *LRP5* puede regular la intensidad de la señal β -catenina y de esta manera, modular la biología del progenitor del adipocito de una manera depósito-específica, promoviendo una acumulación diferencial del tejido adiposo. De hecho, estos hallazgos han conducido a que algunos autores sugieran que la manipulación racional de expresión *LRP5* puede ofrecer un enfoque potencial para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad ⁽³⁶⁾.

Además, en un estudio publicado por Liu et al. ⁽³⁷⁾, en donde al comparar ratones knock-out *LRP6* con los silvestres bajo las mismas condiciones, observaron que ratones *LRP6* knock-out (*LRP6*^{+/-}) eran resistentes a la obesidad inducida por dieta alta en grasas, así como a desarrollar resistencia a insulina. La importancia de este estudio se encuentra en el hecho de que dichos fenotipos presentados por los ratones *LRP6*^{+/-} se encuentran ligados a la inactivación de la vía de mTOR (complejo sensible a rapamicina de mamíferos) que es una quinasa sensible a nutrientes clave que regula la adipogénesis, el peso corporal y la respuesta de la insulina a la ingesta calórica en el tejido adiposo marrón (BAT) y un incremento en la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1), presente en las mitocondrias del BAT y responsable de la estimulación de la termogénesis, y PGC1- α (proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas) que aumenta la actividad transcripcional de PPAR γ por lo que juega un papel importante en el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos.

Es importante mencionar que los diferentes factores involucrados en la transducción de señales de vía Wnt- β -catenina, son factores genéticos potenciales que podrían contribuir al desarrollo de la obesidad, al igual que la proteína LRP6 y LRP5 mencionados anteriormente. Así es importante determinar si polimorfismos e incluso mutaciones localizadas en estos genes pueden ser modificadores o alterar el comportamiento de la vía, que tiene una participación clave en el proceso de la adipogénesis ^(38,39), pueden ser desencadenantes potenciales de la obesidad.

Aunado a lo anterior, también se ha reportado que la expresión de WNT10B, suprime la diferenciación adipogénica y activa la diferenciación osteogénica a través de la inducción de los factores de transcripción osteoblastogénica Runx2, Dlx5 y osterix, y la supresión de los factores de transcripción adipogénicos C/EBP α y PPAR γ , lo que sugiere una participación muy importante de este gen en la regulación de esta vía ⁽⁴⁰⁾ (Figura 4).

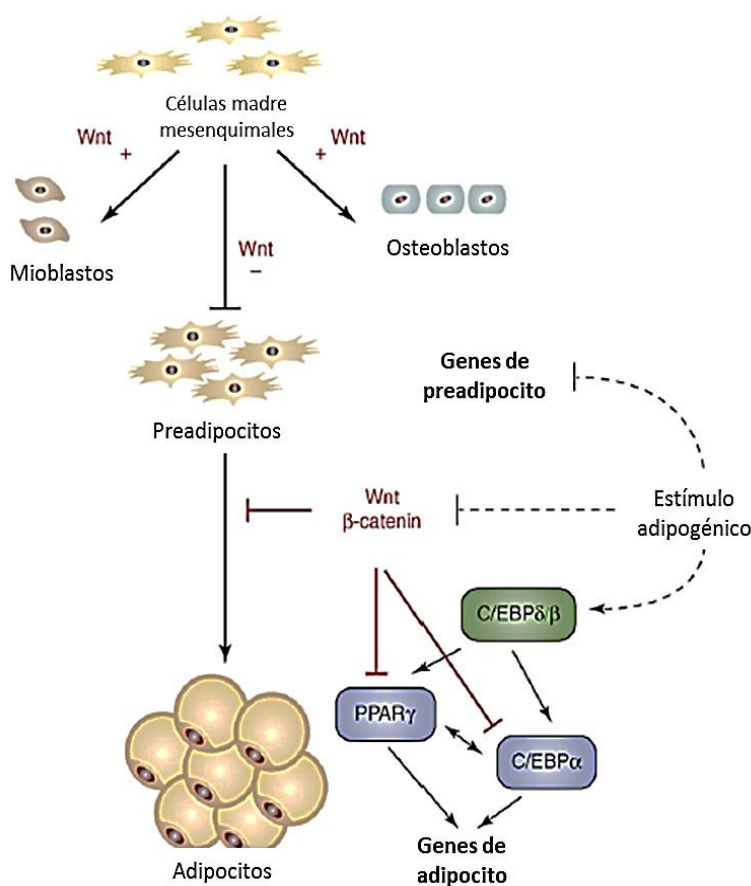


Figura 4. Regulación de la adipogénesis a través de la vía Wnt. (Modif. Christodoulides et al., 2009)

Sin embargo, a pesar de que estudios en modelos celulares y animales demuestran que WNT10B es un componente principal para la regulación de grasa, existen pocos reportes del efecto de variantes en este gen en el fenotipo de obesidad en humanos ⁽⁴¹⁾.

Por otro lado, en cuanto a los receptores relacionados con lipoproteínas de baja densidad, los cuales también juegan un papel importante en la activación de la vía de señalización, para el caso de LRP5, el primer estudio de asociación de variantes con obesidad, fue reportado por Guo y colaboradores en 2006, en el cual observaron una asociación significativa de las variantes rs4988300 y rs634008, con obesidad como variable dicotómica y con IMC y masa grasa como rasgos cuantitativos ⁽⁴²⁾.

Antecedentes directos

A pesar de que la relación entre variantes de la vía Wnt- β -catenina ha sido poco estudiada en relación a la obesidad, esta ha sido de gran interés en estudios relacionados con osteoporosis y parámetros relacionados así como con parámetros metabólicos, los cuales contribuyeron a la selección de variantes en éste estudio debido a que permitieron identificar su probable participación en la patología (Tabla1).

Microarreglo ilumina

Aunado a todo lo anterior, en cuanto a la participación de la vía Wnt/ β -catenina en la regulación de la adipogénesis, en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), se cuenta con resultados preliminares de un estudio de asociación de genes candidato en la plataforma Golden-Gate de Illumina los cuales mostraron que algunos genes involucrados en la vía de Wnt/ β -Catenina, incluidos *LRP5* y *LRP6* se asocian significativamente con obesidad en pacientes mexicanos. Lo cual también resulta interesante ya que nos muestra evidencias de la posible participación de esta vía en la adipogénesis y por lo tanto en la susceptibilidad al desarrollo de obesidad en población mexicana. Resaltando la asociación de

polimorfismos del gen *LRP6*, del cual, a la fecha, no existen reportes de asociación de variantes en éste gen con obesidad (43,44).

Tabla 1. Estrategia de selección de variantes analizadas en el estudio.

Gen	Variante	Selección	Reportes previos (asociación genética)	Población	Tamaño de muestra	Asociación
<i>LRP6</i>	rs2302685 (T/C)	MA y ExAC	Infarto al miocardio (Xu S et al. 2014)	China	285 casos 650 controles	Alelo C (OR=1.62, P=0.039) CT+CC (OR=1.67, P=0.035)
			DMO (Riancho JA et al. 2011)	Española	1043 mujeres >50 años	CC 0.47 D.E. menos que TT (P<0.003)
	rs2075241 (G/C)	ExAC	-	-	-	-
<i>LRP5</i>	rs4988300 (G/T)	Literatura	Geometría y masa ósea (Kiel DP et al. 2007)	USA	1141 individuos -495 hombres -646 mujeres >55 años	DMO mujeres (P=0.025)
			Osteoporosis, estudio familias (Xiong DH et al. 2006)	USA Caucásicos de origen europeo	1873 individuos de 405 familias	Osteoporosis de columna vertebral (P=0.023)
			OB (Guo Y et al. 2006)	USA Caucásicos de origen europeo	1873 individuos de 405 familias	OB (P<0.001) IMC (P=0.001)
	rs312009 (C/T)	MA	Osteoporosis (Panach L et al. 2014)	Española	797 mujeres	GG (OR=2.82, P=0.001)
			Osteoporosis (Agueda L et al. 2008)	Española	964 mujeres post-menopáusicas	TT incremento de 0.07 (0.02-0.13) g/cm ²
	rs3736228 (C/T)	ExAC	DMO (Kim BJ et al. 2016)	China	1627 individuos -802 hombres -825 mujeres	Alelo T con DMO (β = -0.04, P=0.009)
			Fractura (Estrada K et al. 2012)	Ancestría Europea	31016 con historial de fractura (casos) 102444 controles	Alelo T (OR=1.09, P=1.4×10 ⁻⁸)
			DMO (Zhang YP et al 2010)	USA Caucásicos de origen europeo	1000 individuos -499 hombres -501 mujeres 50.3(±18.3) años	Alelo T DMO de espina lumbar (P=0.028)
	<i>WNT10B</i>	rs833840 (C/G)	MA	OB (Kim IC et al. 2011)	Corea	1029 mujeres

MA: Microarreglo Golden Gate Illumina, ExAC: Mexicanos del proyecto del ExAC.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), localizados en genes que participan en la vía de señalización Wnt/ β -Catenina se asocian al riesgo a desarrollar obesidad en pacientes mexicanos.

Objetivos Particulares

- Determinar la frecuencia de los polimorfismos rs312009, rs4988300 y rs3736228 del gen *LRP5*, rs2302685 y rs2075241 del gen *LRP6* y el rs833840 (C/G) del gen *WNT10B* en una muestra de casos y controles mexicanos.
- Determinar si estos SNPs se asocian al desarrollo de obesidad de manera independiente o como haplotipos.
- Establecer si existe correlación entre los polimorfismos identificados con la gravedad de la enfermedad.
- Determinar si existe una asociación dependiente de género, entre los polimorfismos analizados y la obesidad.
- Evaluar si existe interacción génica entre las variantes analizadas localizadas en los genes *WNT10B*, *LPR5*, *LPR6*.

HIPOTESIS

Existe asociación entre los polimorfismos identificados en los genes *WNT10B*, *LPR5*, *LPR6*, y la susceptibilidad a padecer obesidad en población mexicana.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema creciente de salud pública en el mundo y en México se presenta una de las prevalencias más altas. Esta entidad, influye en el desarrollo de otras patologías crónico-degenerativas, lo que hace urgente la identificación de los factores que contribuyen a su etiología. Por lo tanto, analizar

variaciones, en genes que participan en procesos clave como la adipogénesis, es fundamental para identificar factores genéticos involucrados en su etiología.

METODOLOGÍA

Estudio de asociación caso-control

Tipo de estudio

Este es un estudio de carácter observacional porque no se realiza ninguna intervención sobre el factor de estudio, transversal porque solo se analiza la prevalencia de la enfermedad en un periodo determinado, comparativo por la presencia de grupo control, prolectivo por el recabado de información, y retrospectivo por la direccionalidad de la asociación.

Población de estudio

Individuos adultos mexicanos captados de los Hospitales Regional 1º de Octubre, Regional Lic. “Adolfo López Mateos” y de la Clínica de Detección y Diagnóstico Autorizado del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, ISSSTE.

Cada participante fue evaluado por un médico endocrinólogo, quien una vez obtenido el consentimiento informado, llenó la hoja de captación de datos que contiene información demográfica de los pacientes (edad, sexo, origen geográfico); antecedentes familiares y pruebas de laboratorio (glucosa, colesterol y triglicéridos).

Diseño y tamaño de la muestra

El tamaño de muestra (600 pacientes con diagnóstico clínico de obesidad) se determinó tomando en cuenta que éste es un estudio de casos y controles, que la prevalencia de la obesidad en la población mexicana es del 30%, un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia (α) de 0.05, así como la frecuencia alélica más baja de los polimorfismos que se analizarán (1.2%) y un OR de 1.2 a 2.5, el cálculo de la muestra se realizó a con el software QUANTO®.

Criterios de Inclusión

-Casos

Se incluyeron mestizos mexicanos mayores de 30 años con diagnóstico clínico de obesidad realizado con base al IMC según los parámetros de OMS: obesidad grado I cuando el IMC se encuentra entre 30 y 34.9 Kg/m²; obesidad grado II cuando es de 35.0 a 39.9 Kg/m² y obesidad grado III aquellos que presentan un IMC mayor de 40 Kg/m².

-Controles

Se seleccionan individuos mayores de 30 años con un índice de masa corporal entre 18.5 y 24.9 Kg/m²; que el peso fuese igual o estuviera entre un intervalo no mayor a ± 5 kg al alcanzado después de la adolescencia (18 años).

-Sobrepeso

Se incluyó también una muestra de individuos con sobrepeso con un índice de masa corporal mayor de 24.9 Kg/m² y menor a 30 Kg/m²; al igual que los casos mayores de 30 años.

Los casos, controles e individuos con sobrepeso fueron captados en la Ciudad de México, tanto sus padres como sus abuelos nacidos en México o al menos tres abuelos de origen mexicano.

Criterios de exclusión

Se excluyeron a todos aquellos casos de obesidad causada por disfunción endocrinológica, síndromes genéticos, o secundaria a tratamiento farmacológico.

Selección de polimorfismos

Los polimorfismos incluidos en este estudio, se seleccionaron considerando tres criterios; basándonos en los datos preliminares obtenidos en un estudio de asociación de genes candidato en la plataforma Golden-Gate de Illumina en pacientes mexicanos, donde variantes de los genes *LRP5*, *LRP6* y *WNT10B*, mostraron asociación significativa con obesidad. De este análisis, se seleccionaron los polimorfismos; rs2302685 (T/C) del gen *LRP6*, rs312009 (C/T) del gen *LRP5* y el rs833840 (C/G) del gen *WNT10B*. Con base en los datos obtenidos en el Golden Gate para estos genes, también se buscó en otra base de datos, el ExAC, que contiene información de secuenciación del exoma de

población mexicana, si otras variantes en éstos genes se asociaban con obesidad. De este estudio, las variantes asociadas que se incluyeron fueron los SNPs rs2302685 (T/C) y rs2075241 (G/C) del gen *LRP6* y rs3736228 (C/T) del gen *LRP5*. Tomando en cuenta lo reportado en la literatura, se incluyó el SNP rs4988300 (G/T) del gen *LRP5*, el cual ya se había reportado asociado con obesidad ⁽⁴²⁾. Es importante mencionar que la variante rs2302685 (T/C), fue la única que mostró asociación con obesidad en ambos análisis.

Genotipificación de SNPs

Se analizaron un total de 6 SNPs en los genes, *WNT10B*, *LPR5*, *LPR6*. Es importante mencionar que en nuestra población no se conoce la distribución ni la frecuencia de estos polimorfismos.

Discriminación alélica por el método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)

La discriminación alélica de los SNPs seleccionados se realizó utilizando la metodología TaqMan. Para este ensayo se diseñan dos sondas específicas para cada SNP y se marcan en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, las cuales en el extremo 3' tienen un "quencher" (TAMRA), que inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda permanece intacta. Durante la reacción de PCR los primers y la sonda específica hibridan con la secuencia complementaria en el templado de DNA, al momento que inicia la síntesis de la cadena de DNA, la DNA polimerasa AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3' digiere la sonda marcada, liberando al fluorocromo de la acción del "quencher", lo que permite con base en el tipo de fluorescencia emitida discriminar entre un alelo y otro.

Diseño Estadístico

La frecuencia de los SNPs analizados en una muestra de individuos mexicanos sanos y con obesidad se reportó en porcentaje. La asociación se determinó en casos y controles mediante las pruebas chi cuadrada y exacta de Fisher. Para determinar si estos polimorfismos contribuyen al desarrollo de la gravedad de la obesidad se aplicó un análisis de regresión logística. El riesgo relativo fue estimado por razón de momios (ORs) con intervalo de confianza del 95%, tanto éste análisis como el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizaron con el

software FINETTI (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para identificar los factores genotípicos capaces de predecir de manera significativa el fenotipo de este grupo de pacientes, las asociaciones potenciales entre cada una de las variables se buscaron a través de análisis bivariado: variantes alélicas en los genes potencialmente modificadores y el IMC, la presión arterial sistólica y diastólica, la glucosa, el colesterol y los triglicéridos; este análisis se realizó mediante un modelo de regresión lineal con PLINK v1.07 considerando éstos rasgos cuantitativos y el género y la edad como covariables. El desequilibrio de ligamiento entre las variantes de cada gen y la frecuencia de los haplotipos se analizó utilizando el software Haploview version 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/>). Para evaluar la interacción génica entre las variantes analizadas de los tres genes incluidos en éste estudio y la presencia de obesidad se llevó a cabo un análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR, del inglés multifactor dimensionality reduction). Para identificar el tamaño y dirección (sinergia o redundancia) de la interacción o epistasis entre las variantes y su asociación con la patología, se realizó la descomposición de entropía y se presentó un gráfico de interacción.

En cada prueba de hipótesis se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis genético y la genotipificación se realizaron en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

RESULTADOS

Población de estudio

En este trabajo de investigación, se incluyeron un total de 1515 mexicanos no relacionados con un rango de edad de 20 a 80 años. De los cuales, basados en el IMC, 641 fueron individuos con normopeso (18.5 a 24.9 Kg/m²), 226 con sobrepeso (IMC entre 25 y 30 Kg/m²) y 648 pacientes con diagnóstico clínico de obesidad (IMC >30 Kg/m²). De los 641 individuos del grupo control, 415 (65%) son mujeres y 226 (35%) hombres, con una edad promedio de 40.6±8.7 años. De los individuos con sobrepeso, 106 (47%) mujeres y 120 (53%) varones, con una edad promedio de 45.2±9.0 años. Respecto a los pacientes con obesidad, 214 (34%) de

género masculino y 434 (66%) de género femenino, con una edad promedio de 45.3±9.8 años. Los pacientes con obesidad fueron clasificados de acuerdo con la gravedad en: 336 con obesidad tipo I, 188 con obesidad tipo II y el resto 124, con obesidad tipo III u obesidad mórbida. De acuerdo a lo esperado, los valores de los parámetros clínicos: niveles en suero de glucosa, colesterol total, triglicéridos, así como la presión sanguínea, fueron significativamente mayores en los individuos con obesidad y sobrepeso que en los controles ($P<0.001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas de la población de estudio.

Población de estudio (n= 1515)	Normo-peso	Sobrepeso	Obesos	χ^2*
N (mujeres/hombres)	415(65%)/ 226(35%)	106(46.9%)/ 120(53.1%)	434(67%)/ 214(33%)	
IMC (kg/m²)				
Mujeres	23.1(±1.5)	27.9(±1.2)	37.0(±5.9)	
Hombres	23.5(±1.4)	27.9(±1.2)	34.3(±4.7)	
Edad (años)	40.6(±8.7)	45.2(±9.0)	45.3(±9.8)	
Glucosa (mg/dl)	89.6(±12.1)	98.0(±26.8)	108.2(±35.4)	97.99
Colesterol (mg/dl)	174.2(±29.6)	185.8(±37.2)	194.1(±39.5)	28.26
Triglicéridos (mg/dl)	127.0(±67.6)	183.2(±116.2)	205.4(±125.3)	134.55
PA Sistólica (mmHg)	110.8 (±12.0)	119.7(±16.5)	126.0(±17.1)	238.72
PA Diastólica (mmHg)	73.04 (±9.1)	78.0(±8.9)	81.2(±10.4)	203.26

* $P<0.001$

Genotipificación

Estudio de asociación de polimorfismos de los genes LRP5, LRP6 y WNT10B con obesidad.

La distribución de los genotipos de los polimorfismos analizados se observó en equilibrio de Hardy Weinberg.

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada variante (Tabla 3) y posteriormente se realizó un análisis comparativo de las frecuencias de las variantes entre los casos y los controles, para polimorfismos en los genes, *LRP5* (rs3736228C/T, rs312009C/T y rs4988300G/T), *LRP6* (rs2302685T/C y rs2075241G/C) y *WNT10B* (rs833840C/G).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de las variantes analizadas en los genes *LRP5*, *LRP6* y *WNT10B*

GEN	SNP	Controles			Casos		
		GG	GT	TT	GG	GT	TT
<i>LRP5</i>	rs4988300	51.6	39.3	9.1	57.9	31.9	10.2
	rs312009	78.1	19.8	2.1	80.3	17.1	2.6
	rs3736228	67.6	28.2	4.2	63.3	31.4	5.3
<i>LRP6</i>	rs2302685	83.4	15.8	0.8	87.3	11.2	1.5
	rs2075241	63.7	32.2	4.1	60.1	33.8	6.1
<i>WNT10B</i>	rs833840	44	45.8	10.2	46.6	43.5	9.9

El análisis de asociación para cada SNP se realizó mediante un estudio de casos y controles; tanto como alelo y bajo los diferentes modelos de herencia (dominante, recesivo, aditivo), así como por análisis de regresión logística. Por otro lado, para ver la asociación de estas variantes con los parámetros cuantitativos, se realizó un análisis de regresión lineal, ajustando por edad y género. Además, se realizó el análisis de haplotipos para los genes con dos o más SNPs y el análisis de interacción génica entre todas variantes analizadas en este estudio.

Gen *LRP5*

En el estudio de casos y controles no se observó asociación significativa para ninguna de las tres variantes analizadas para este gen en la población total (Tabla 3).

Tabla 4. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen *LRP5*.

GEN	SNP (AM)	Alélica		Dominante		Recesivo		Aditivo	
		OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P
<i>LRP5</i>	rs312009 (T)	0.92(0.71-1.18)	0.500	0.84(0.63-1.13)	0.250	1.18(0.55-2.50)	0.673	0.87(0.66-1.16)	0.346
	rs4988300 (T)	0.96(0.80-1.15)	0.641	0.83(0.65-1.07)	0.146	1.09(0.73-1.63)	0.660	0.88(0.70-1.11)	0.289
	rs3736228 (T)	1.19(0.97-1.46)	0.095	1.19(0.92-1.54)	0.176	1.36(0.78-2.35)	0.274	1.21(0.95-1.55)	0.118

AM: Alelo menor, OR: odds ratio

Sin embargo, al estratificar por gravedad a nuestra población de estudio para cada una de las variantes, se observó que el alelo menor (T) de la variante rs312009, del gen *LRP5*, muestra una tendencia de asociación (OR=0.62, IC 95%0.37-1.05,

$P=0.070$) y bajo un modelo aditivo ($OR=0.57$, $IC95\%0.32-1.01$, $P=0.053$) con obesidad tipo III (Tabla 4). Para el caso de las variantes rs4988300 y rs3736228 no se observó ningún resultado significativo al estratificar por gravedad.

Tabla 5. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen *LRP5* estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.

GEN	SNP	MODELO	OB I		OB II		OB III	
			OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P
<i>LRP5</i>	rs312009	Alélica	0.99(0.73-1.33)	0.932	0.99(0.68-1.45)	0.975	0.62(0.37-1.05)	0.070
		Dominante	0.89(0.63-1.28)	0.536	0.96(0.62-1.49)	0.844	0.55(0.30-1.01)	0.051
		Recesivo	1.35(0.57-3.20)	0.494	1.14(0.37-3.55)	0.822	0.78(0.17-3.49)	0.740
		Aditivo	0.94(0.67-1.31)	0.712	0.98(0.64-1.48)	0.904	0.57(0.32-1.01)	0.053
	rs4988300	Alélica	0.96(0.76-1.20)	0.690	0.81(0.60-1.11)	0.186	1.25(0.90-1.73)	0.180
		Dominante	0.82(0.60-1.11)	0.200	0.79(0.53-1.17)	0.233	0.94(0.59-1.51)	0.800
		Recesivo	1.11(0.68-1.79)	0.679	0.74(0.36-1.51)	0.408	1.83(0.97-3.47)	0.060
		Aditivo	0.87(0.66-1.16)	0.350	0.78(0.53-1.13)	0.184	1.11(0.73-1.70)	0.622
	rs3736228	Alélica	1.18(0.93-1.52)	0.178	1.15(0.84-1.57)	0.380	1.27(0.89-1.80)	0.185
		Dominante	1.14(0.84-1.55)	0.401	1.27(0.87-1.85)	0.215	1.22(0.78-1.90)	0.389
		Recesivo	1.46(0.77-2.76)	0.247	0.97(0.39-2.43)	0.952	1.64(0.68-3.95)	0.262
		Aditivo	1.18(0.88-1.58)	0.262	1.23(0.86-1.77)	0.262	1.27(0.84-1.93)	0.263

OR: odds ratio

Interesantemente, después de la estratificación por género, la tendencia de asociación con obesidad tipo III observada para la variante rs312009 en la clasificación por grado de obesidad, mostró una asociación significativa con protección para el desarrollo de obesidad tipo III, únicamente para el grupo de las mujeres ($OR=0.54$, $IC95\%0.30-0.99$, $P=0.043$) (Tabla 5). Este mismo comportamiento se observó para la variante rs4988300, bajo los modelos dominante ($OR=0.64$, $IC95\%0.47-0.88$, $P=0.006$) y aditivo ($OR=0.73$, $IC95\%0.55-0.97$, $P=0.032$) (Tabla 5). Por otro lado, a diferencia de lo observado para las otras dos variantes, al estratificar por género la variante rs3736228, analizada para este gen, mostró una asociación significativa con riesgo, únicamente para el grupo de hombres, tanto como alelo rs3736228T ($OR=1.57$, $IC 95\%1.09-2.26$, $P=0.015$), así como bajo un modelo aditivo ($OR=1.58$, $IC 95\%1.03-2.42$, $P=0.036$). Además, al estratificar a éste grupo por gravedad esta variante mostró asociación con obesidad tipo I, como alelo ($OR=1.64$, $IC 95\%1.10-2.46$, $P=0.015$) y bajo un modelo recesivo ($OR=3.15$, $IC 95\%1.10-8.97$, $P=0.025$) (Tabla 5).

Tabla 6. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen *LRP5* estratificando a la población por género y gravedad de la enfermedad.

GEN	SNP	MODELO	Total		OB I		OB II		OB III	
			OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P
<i>LRP5</i>	rs312009 (mujeres)	Alélica	0.99(0.73-1.33)	0.924	1.14(0.79-1.63)	0.494	1.12(0.73-1.71)	0.605	0.54(0.30-0.99)	0.043
		Dominante	0.95(0.67-1.35)	0.774	1.10(0.71-1.70)	0.665	1.07(0.64-1.78)	0.793	0.54(0.28-1.07)	0.075
		Recesivo	1.10(0.46-2.63)	0.83	1.34(0.48-3.76)	0.579	1.35(0.41-4.42)	0.616	0.39(0.05-3.10)	0.357
		Aditivo	0.97(0.69-1.35)	0.842	1.13(0.75-1.70)	0.568	1.10(0.68-1.78)	0.692	0.53(0.27-1.01)	0.051
	rs4988300 (mujeres)	Alélica	0.87(0.69-1.09)	0.229	0.95(0.71-1.28)	0.728	0.62(0.42-0.92)	0.016	1.12(0.77-1.62)	0.546
		Dominante	0.64(0.47-0.88)	0.006	0.61(0.40-0.93)	0.02	0.58(0.35-0.96)	0.032	0.85(0.50-1.44)	0.549
		Recesivo	1.10(0.67-1.80)	0.704	1.39(0.77-2.50)	0.277	0.48(0.18-1.29)	0.142	1.57(0.74-3.33)	0.235
		Aditivo	0.73(0.55-0.97)	0.032	0.75(0.52-1.09)	0.135	0.56(0.35-0.90)	0.016	0.99(0.61-1.59)	0.952
	rs3736228 (hombres)	Alélica	1.57(1.09-2.26)	0.015	1.64(1.10-2.46)	0.015	1.52(0.85-2.74)	0.157	1.22(0.52-2.88)	0.649
		Dominante	1.46(0.93-2.30)	0.097	1.39(0.83-2.31)	0.207	1.60(0.78-3.29)	0.200	1.66(0.63-4.40)	0.304
		Recesivo	2.52(0.92-6.90)	0.065	3.15(1.10-8.97)	0.025	1.86(0.36-9.73)	0.453	0.86(0.05-16.16)	0.473
		Aditivo	1.58(1.03-2.42)	0.036	1.58(0.98-2.54)	0.059	1.63(0.82-3.25)	0.165	1.48(0.56-3.90)	0.427

OR: odds ratio

Al realizar el análisis de regresión logística, ajustando por género y edad, no se observó asociación significativa para ninguna de las variantes del gen *LRP5* analizadas ($P > 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 7. Regresión logística de los SNPs analizados del gen *LRP5*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	OR(95%CI)	P*
rs312009		T	68077238		0.900(0.699-1.159)	0.4157
rs4988300	11	T	68088831	OBESIDAD	1.032(0.646-1.648)	0.8944
rs3736228		T	68201295		1.158(0.943-1.421)	0.1599

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases; OR: odds ratio.

*Todos los datos de P, se ajustaron, por género y edad.

En cuanto al análisis de regresión lineal el cual se realizó, con los parámetros cuantitativos, para las tres variantes, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa para ningún parámetro ($P > 0.05$) (Tabla 7).

Tabla 8. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen *LRP5*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	BETA	P*
rs312009	11	T	68077238	IMC	-0.712(-1.532-0.108)	0.0890
				GLUCOSA	0.851(-2.675-4.376)	0.6363
				COLESTEROL	1.746(-3.9-7.393)	0.5445
				TRIGLICÉRIDOS	-3.076(-17.85-11.7)	0.6834
				PA SIST	0.892(-1.231-3.015)	0.4105
				PA DIAST	1.302(-0.062-2.666)	0.0616
rs4988300	11	T	68088831	IMC	0.121(-1.239-1.481)	0.8613
				GLUCOSA	-3.175(-10.25-3.902)	0.3796
				COLESTEROL	2.518(-6.806-11.84)	0.5968
				TRIGLICÉRIDOS	5.124(-23-33.25)	0.7212
				PA SIST	0.423(-3.183-4.029)	0.8182
				PA DIAST	0.795(-1.513-3.104)	0.4997
rs3736228	11	T	68201295	IMC	0.071(-0.771-0.913)	0.8682
				GLUCOSA	2.407(-0.473-5.287)	0.1017
				COLESTEROL	-1.423(-6.1-3.254)	0.5511
				TRIGLICÉRIDOS	7.385(-4.398-19.17)	0.2196
				PA SIST	0.085(-1.631-1.801)	0.9229
				PA DIAST	0.193(-0.916-1.301)	0.7333

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases.

***Todos los datos de P, se ajustaron, por género y edad.**

Respecto al análisis de haplotipos, donde se incluyeron las tres variantes (rs312009C/T, rs4988300G/T y rs3736228C/T) analizadas del gen *LRP5*, se observó mayor desequilibrio de ligamiento (DL) entre las variantes rs312009C/T y rs4988300G/T ($D'=86$) (Figura 5). De las 6 combinaciones documentadas con frecuencias mayores al 1%, encontramos que el haplotipo CGT conformado por los alelos mayores de las variantes rs312009C/T y rs4988300G/T y el menor de la variante rs3736228C/T con una frecuencia del 16%, mostró asociación significativa ($P=0.016$) con riesgo a desarrollo de obesidad ($OR=1.33$, IC 95%1.04-1.62), la cual se mantiene incluso después de diez mil permutaciones ($P=0.047$) (Tabla 8).

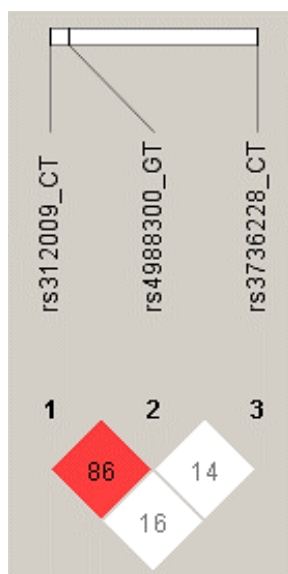


Figura 5. Análisis de desequilibrio de ligamiento para las variantes analizadas del gen *LRP5*.

Tabla 9. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen *LRP5*.

HAPLOTIPO	FREC	A_Unaf	FRECUENCIA (caso,control)	OR	STAT	P	P 10mPer
CGC	0.671	767.7 : 400.3, 842.1 : 385.9	0.657, 0.686	0.88 (0.74-1.04)	2.7	0.1	0.0471
CGT	0.165	213.9 : 954.1, 181.1 : 1046.9	0.183, 0.147	1.33 (1.04-1.62)	5.84	0.0157	
TGC	0.0957	108.3 : 1059.7, 120.8 : 1107.2	0.093, 0.098	0.93 (0.71-1.23)	0.202	0.653	
CTC	0.0342	43.2 : 1124.8, 39.1 : 1188.9	0.037, 0.032	1.17 (0.75-1.81)	0.979	0.322	
TGT	0.0188	20.5 : 1147.5, 24.9 : 1203.1	0.018, 0.020	0.88 (0.49-1.58)	0.316	0.574	
CTT	0.0143	14.4 : 1153.6, 20.0 : 1208.0	0.012, 0.016	0.73 (0.37-1.46)	1.1	0.295	

A_Unaf: afectado_no afectado; OR: odds ratio; 10mPer: diez mil permutaciones.

Al realizar la estratificación por género se observó asociación de significativa, con riesgo (OR=1.64, IC 95%1.10-2.47), de la misma combinación (CGT) únicamente para el grupo de los hombres (Tabla 9).

Tabla 10. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen *LRP5* estratificando a la población por género.

HAPLOTIPO	Género	FREC	A_Unaf	FRECUENCIA (caso,control)	OR	x2	P	P 10mPer
CGT	Mujeres	0.174	144.0 : 636.0, 129.6 : 662.4	0.185, 0.164	-	1.2	0.2733	-
	Hombres	0.149	70.8 : 319.2, 52.0 : 384.0	0.181, 0.119	1.64(1.10-2.47)	6.299	0.0121	0.0462

A_Unaf: afectado_no afectado; OR: odds ratio; 10mPer: diez mil permutaciones.

Gen *LRP6*

Respecto al análisis de los polimorfismos del gen *LRP6*, el estudio de casos y controles de la variante rs2302685 mostró una asociación significativa con protección a padecer obesidad bajo los modelos dominante (OR=0.63, IC 95%0.45-0.88, $P=0.006$) y aditivo (OR=0.68, IC 95%0.50-0.94, $P=0.018$), mientras que la variante rs2075241, no mostró asociación ni como alelo, ni bajo ningún modelo (Tabla 10).

Tabla 11. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen *LRP6*.

GEN	SNP	Alélica		Dominante		Recesivo		Aditivo	
		OR(95%IC)	<i>P</i>	OR(95%IC)	<i>P</i>	OR(95%IC)	<i>P</i>	OR(95%IC)	<i>P</i>
LRP6	rs2302685	0.76(0.56-1.02)	0.063	0.63(0.45-0.88)	0.006	1.79(0.59-5.37)	0.295	0.68(0.50-0.94)	0.018
	rs2075241	1.18(0.97-1.43)	0.100	1.11(0.87-1.42)	0.405	1.58(0.93-2.69)	0.092	1.16(0.92-1.47)	0.208

OR: odds ratio

Al estratificar por gravedad nuestra población de estudio, la asociación de la variante rs2302685 se mantuvo únicamente para obesidad tipo I bajo un modelo dominante (OR=0.64, IC 95%0.43-0.97, $P=0.033$) (Tabla 11).

Tabla 12. Asociación alélica y genotípica de los SNPs analizados del gen *LRP6* estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.

GEN	SNP	MODELO	OB I		OB II		OB III	
			OR(95%IC)	<i>P</i>	OR(95%IC)	<i>P</i>	OR(95%IC)	<i>P</i>
LRP6	rs2302685	Alélica	0.78(0.54-1.11)	0.164	0.75(0.48-1.91)	0.224	0.70(0.40-1.25)	0.230
		Dominante	0.64(0.43-0.97)	0.033	0.67(0.40-1.11)	0.120	0.53(0.27-1.05)	0.063
		Recesivo	1.86(0.53-6.49)	0.322	1.39(0.27-7.23)	0.696	2.19(0.42-11.48)	0.340
		Aditivo	0.70(0.48-1.03)	0.071	0.70(0.43-1.15)	0.155	0.60(0.32-1.14)	0.117
	rs2075241	Alélica	1.13(0.89-1.43)	0.307	1.14(0.85-1.53)	0.392	1.36(0.98-1.89)	0.063
		Dominante	1.05(0.78-1.41)	0.767	1.09(0.75-1.58)	0.658	1.33(0.87-2.03)	0.189
		Recesivo	1.52(0.81-2.86)	0.189	1.44(0.65-3.18)	0.369	1.96(0.85-4.52)	0.111
		Aditivo	1.1(0.83-1.46)	0.514	1.13(0.79-1.61)	0.511	1.40(0.93-2.09)	0.103

OR: odds ratio

En cuanto a la estratificación por género no se obtuvo ningún resultado significativo para ninguna de las dos variantes analizadas para este gen.

Al realizar el análisis mediante regresión logística, ajustando por las variables; género y edad, no se observó resultado significativo de asociación con obesidad para ninguna de las dos variantes analizadas de este gen (Tabla 12).

Tabla 13. Regresión logística de los SNPs analizados del gen *LRP6*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	OR(95%CI)	P*
rs2075241	12	C	12291479	OBESIDAD	1.167(0.956-1.425)	0.1294
rs2302685		C	12301898		0.831(0.615-1.125)	0.2312

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases; OR: odds ratio.

*Todos los datos de *P*, se ajustaron, por género y edad.

Además del análisis de asociación con obesidad como variable dicotómica, se realizó un análisis de regresión lineal tomando el IMC como variable continua. Para este análisis únicamente la variante rs2075241C mostró asociación significativa con incremento en el IMC (BETA= 0.673, *P*=0.044) (Tabla 13). De igual manera se realizaron regresiones lineales para cada uno de los parámetros cuantitativos, ajustando por género y edad, para cada una de las variantes; los resultados mostraron que la variante rs2075241C, además de encontrarse asociada a un incremento en el IMC, mostró asociación con incremento, de tanto, presión sistólica (BETA= 2.02, *P*=0.015) como diastólica (BETA= 1.32, *P*=0.015) (Tabla 13). Para el caso de la variante rs2302685, se observó que los portadores del alelo menor (C) mostraron una asociación significativa con un incremento en los niveles de colesterol de 8.25 unidades (*P*=0.016) (Tabla 13).

Tabla 14. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen *LRP6*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	BETA	P*
rs2075241	12	C	12291479	IMC	0.673(0.018-1.328)	0.0444
				GLUCOSA	0.852(-1.96-3.665)	0.5528
				COLESTEROL	-0.279(-4.622-4.063)	0.8997
				TRIGLICÉRIDOS	8.904(-2.47-20.28)	0.1253
				PA SIST	2.02(0.389-3.652)	0.0154
				PA DIAST	1.323(0.263-2.382)	0.0146
rs2302685	12	C	12301898	IMC	-0.585(-1.548-0.377)	0.2334
				GLUCOSA	-0.284(-4.562-3.995)	0.8967
				COLESTEROL	8.246(1.56-14.93)	0.0158
				TRIGLICÉRIDOS	-2.342(-19.92-15.24)	0.7941
				PA SIST	0.693(-1.765-3.15)	0.5809
				PA DIAST	0.200(-1.394-1.793)	0.8061

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases.

*Todos los datos de *P*, se ajustaron, por género y edad.

Se realizó también el análisis de haplotipos incluyendo las dos variantes del gen *LRP6*, lo cual evidenció un valor de D' de 56 al evaluar el desequilibrio de ligamiento entre ambas variantes analizadas (Figura 6), además de que en el estudio de asociación la combinación GC, que contiene el alelo mayor de la variante rs2075241G/C y el alelo menor del SNP rs2302685T/C, mostró una asociación significativa con protección (OR=0.71, IC 95%0.52-0.98, $P=0.031$) (Tabla 14).



Figura 6. Análisis de desequilibrio de ligamiento para las variantes analizadas del gen *LRP6*.

Tabla 15. Análisis de asociación de los haplotipos con frecuencia >1% de los SNPs analizados del gen *LRP6*.

HAPLOTIPO	FREC	A_Unaf	FRECUENCIA (caso,control)	x2	P	OR	P 10mPer
GT	0.714	879.2 : 354.8, 908.3 : 359.7	0.713, 0.716	0.045	0.8325	0.71(0.52-0.98)	-
CT	0.206	266.4 : 967.6, 247.9 : 1020.1	0.215, 0.196	1.582	0.2085		
GC	0.07	72.6 : 1161.4, 102.5 : 1165.5	0.059, 0.081	4.677	0.0306		
CC	0.01	15.8 : 1218.2, 9.2 : 1258.8	0.013, 0.007	1.949	0.1627		

A_Unaf: afectado_no afectado; OR: odds ratio; 10mPer: diez mil permutaciones.

Gen *WNT10B*

Finalmente, la variante rs833840G de gen *WNT10B*, solo mostró asociación significativa con riesgo a desarrollar obesidad tipo III, tanto como alelo (OR=1.38, IC 95%1.03-1.86, $P=0.032$), así como, bajo los modelos dominante (OR=1.67, IC 95%1.06-2.63, $P=0.026$) y aditivo (OR=1.69, IC 95%1.09-2.61, $P=0.018$). En este SNP, no se observó ninguna asociación dependiente de género (Tabla 15).

Tabla 16. Asociación alélica y genotípica del SNP analizado del gen *WNT10B* estratificando a la población por gravedad de la enfermedad.

GEN	SNP	MODELO	OB I		OB II		OB III	
			OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	P
<i>WNT10B</i>	rs833840	Alélica	0.90(0.73-1.11)	0.309	0.77(0.59-1.00)	0.051	1.38(1.03-1.86)	0.032
		Dominante	0.83(0.62-1.10)	0.196	0.72(0.51-1.04)	0.076	1.67(1.06-2.63)	0.026
		Recesivo	0.88(0.55-1.42)	0.611	0.63(0.33-1.20)	0.156	1.77(0.90-3.50)	0.096
		Aditivo	0.84(0.64-1.10)	0.204	0.71(0.50-0.99)	0.062	1.69(1.09-2.61)	0.018

Se realizó el análisis de regresión logística con obesidad, pero no se observó resultado significativo ($P > 0.05$) (Tabla 16).

Tabla 17. Regresión logística del SNP analizado del gen *WNT10B*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	OR	P*
rs833840	12	G	49366150	OBESIDAD	0.988(0.826-1.182)	0.8968

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases; OR: odds ratio.

*Todos los datos de P, se ajustaron, por género y edad.

De igual manera que el resto de las variantes, se realizó el análisis de regresión lineal para los parámetros cuantitativos en donde se observó que la variante rs833840G se asocia con disminución de presión arterial sistólica (Tabla 17).

Tabla 18. Regresión lineal para los parámetros cuantitativos de los SNPs analizados del gen *LRP6*.

SNP	CHR	AM	pb	PARÁMETRO	BETA	P*
rs833840	12	G	49366150	IMC	0.248(0.328-0.824)	0.3983
				GLUCOSA	1.1(-1.365-3.566)	0.382
				COLESTEROL	-1.786(-5.756-2.184)	0.3782
				TRIGLICÉRIDOS	-6.901(-17.17-3.368)	0.1881
				PA SIST	-1.462(-2.916-0.007)	0.0492
				PA DIAST	-0.286(-1.229-0.658)	0.5531

CHR: cromosoma; AM: alelo menor; pb: pares de bases.

*Todos los datos de P, se ajustaron, por género y edad.

Análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR)

El análisis de MDR con la combinación de datos no mostró efecto significativo de interacción en ninguno de los modelos ($P > 0.05$). De acuerdo a la consistencia de validación cruzada (CVC) y a la exactitud de la prueba, el mejor modelo fue el modelo 2 (Tabla 18), que incluye a dos variantes del mismo gen (*LRP5*). Cabe mencionar que, en el gráfico, al observar tanto los valores (negativos) como las

líneas que indican la relación que existe entre las variantes, se observa que existe redundancia, lo cual concuerda con lo observado en el análisis de haplotipos en donde se presenta cierto grado de desequilibrio de ligamiento entre estas variantes. No se observó interacción entre los genes analizados considerando las variantes incluidas en este estudio.

Tabla 19. Mejor modelo candidato estimado por reducción de dimensionalidad multifactorial.

	Modelo	Exactitud de entrenamiento	Exactitud de prueba	CVC
1	rs4988300	0.5438	0.5212	10/10
2	rs4988300,rs3736228	0.5696	0.5648	10/10
3	rs312009,rs4988300,rs3736228	0.5917	0.5463	5/10

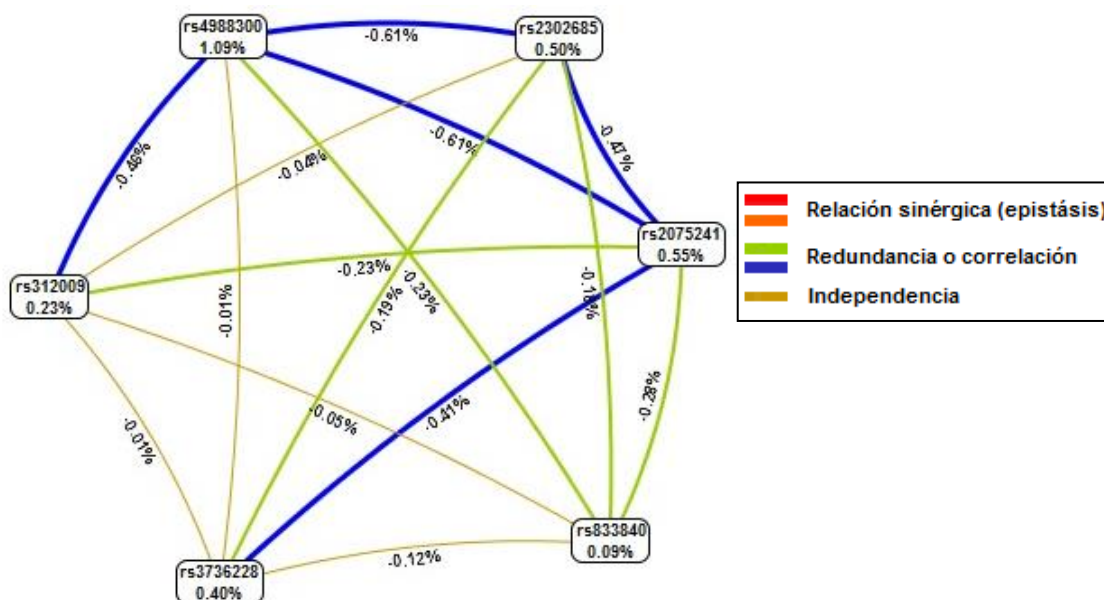


Figura 7. Gráfico de interacción por reducción de dimensionalidad multifactorial, de las variantes; rs2302685, rs2075241, rs4988300, rs312009, rs3736228 y rs833840.

Comparación entre las frecuencias observadas en este estudio con las reportadas en las poblaciones continentales

Se realizaron comparaciones de las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio para cada una de las variantes, con lo reportado en la base de datos de 1000 genomas para otras poblaciones mundiales como; Residentes de Utha con ancestría europea del norte y del este (CEU), poblaciones ibéricas en España

(IBS), Yorubas (YRI), Chinos Han de Beijing (CHB), Chinos Han del Sur (CHS), Japoneses (JPT) y Mexicanos de Los Ángeles (MXL).

Para el caso del gen *LRP5*; al comparar la frecuencia del alelo menor (T) de la variante rs4988300 (0.284), se observó que ésta es significativamente diferente ($P < 0.01$) de las poblaciones CEU, IBS, YRB y CHB o CHS, pero similar con MXL y CHB o CHS. Por otro lado, la variante del mismo gen rs312009, la cual en este estudio, la frecuencia del alelo menor (T) fue de 0.119, mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con todas las poblaciones reportadas, a excepción de la población MXL ($P = 0.462$), mientras que la otra variante, la rs3736228, presentó una frecuencia del alelo menor (T) de 0.197, la cual al ser comparada con las poblaciones continentales mostró diferencias significativas con CEU, YRB y JPT ($P < 0.05$); mientras que con MXL, IBS, CHB y CHS, las frecuencias fueron similares ($P > 0.05$). En cuanto a las variantes analizadas del gen *LRP6*; al comparar la frecuencia del SNP rs2302685C (0.084), también presentó diferencias significativas con las poblaciones CEU, IBS, CHB y CHS ($P < 0.05$), pero similares con MXL, YRI y JPT ($P > 0.05$) Mientras que notablemente, a diferencia de las anteriores variantes, el SNP rs2075241C, mostró un comportamiento muy similar a la población CEU ($P = 0.093$), pero mostró diferencias significativas con las frecuencias del resto de las poblaciones analizadas en este estudio ($P < 0.05$). Finalmente, la variante rs833840 localizada en el gen *WNT10B*, que mostró una frecuencia del alelo menor (G) de 0.325 en nuestra población de estudio, con excepción de la población MXL ($P = 0.321$), mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con el resto de las poblaciones continentales (Tabla 19).

Tabla 20. Comparación de las frecuencias alélicas de las variantes analizadas con lo reportado en 1000 Genomas.

GEN	SNP	AM	MM (1521)	MXL (64)	<i>P</i>	CEU (99)	<i>P</i>	IBS (107)	<i>P</i>	YRB (108)	<i>P</i>	JPT (104)	<i>P</i>	CHB (103)	<i>P</i>	CHS (105)	<i>P</i>
<i>LRP5</i>	rs4988300	T	0.284	0.297	0.751	0.483	6×10^{-7}	0.523	1×10^{-8}	0.644	1×10^{-8}	0.250	0.302	0.184	2×10^{-3}	0.271	0.705
	rs312009	T	0.119	0.141	0.462	0.217	6×10^{-5}	0.168	0.035	0.171	0.024	0.308	1×10^{-8}	0.286	1×10^{-8}	0.267	1×10^{-8}
	rs3736228	T	0.197	0.203	0.868	0.121	9×10^{-3}	0.192	0.844	0.019	1×10^{-8}	0.260	0.031	0.180	0.541	0.214	0.549
<i>LRP6</i>	rs2302685	C	0.084	0.078	0.863	0.177	9×10^{-6}	0.140	4×10^{-3}	0.069	0.505	0.067	0.445	0.136	9×10^{-3}	0.043	0.042
	rs2075241	C	0.217	0.125	0.010	0.167	0.093	0.107	1×10^{-4}	0.301	5×10^{-3}	0.087	2×10^{-6}	0.078	3×10^{-5}	0.095	8×10^{-6}
<i>WNT10B</i>	rs833840	G	0.325	0.367	0.321	0.434	2×10^{-3}	0.397	0.031	0.125	1×10^{-8}	0.577	1×10^{-8}	0.456	1×10^{-4}	0.576	1×10^{-8}

AM: alelo menor.

DISCUSIÓN

La obesidad, es una entidad que se caracteriza por un exceso de almacenamiento de grasa, principalmente en el tejido adiposo mediante la adipogénesis. En este proceso, las células mesenquimales indiferenciadas se transforman en células capaces de almacenar lípidos y secretar adipocinas. En la obesidad, éste proceso está incrementado, dando como consecuencia una expansión y acumulación de tejido adiposo, que se asocia con un mayor riesgo a desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

En este contexto, varios estudios tanto en líneas celulares como en modelos animales han demostrado el papel crucial de la señalización de la vía Wnt β -catenina, en la regulación del proceso de adipogénesis, tanto en la diferenciación como en la maduración de los adipocitos ^(25,33,35,50). Sin embargo, aun cuando la adipogénesis es un proceso muy importante en la fisiopatología de la obesidad, a la fecha, existen muy pocos reportes de la implicación de los factores genéticos en la regulación de esta vía.

Así, dada la complejidad de esta vía, en este trabajo se inició el estudio de 6 SNPs localizados en los genes *LRP5*, *LRP6* y *WNT10B*; principales reguladores tanto del encendido como del apagado de la misma ⁽⁵¹⁾, para conocer su frecuencia en nuestra población, así como para evaluar su asociación en el desarrollo de la obesidad o en la gravedad de la misma.

En particular, se ha documentado que la expresión de *WNT10B*, suprime la diferenciación de las células mesenquimales en adipocitos ⁽⁵²⁾. Inclusive, en estudios *in vitro*, la sobreexpresión de esta proteína, en células mesenquimales bipotenciales ST2, así como en fibroblastos de embriones de ratón, bloquea la adipogénesis y estimula la osteoblastogénesis ⁽³²⁾.

Por otro lado, los genes *LRP5* y *LRP6*, que codifican para las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad, son miembros de la familia de proteínas LDLR y estructuralmente están compuestas por los mismos motivos básicos que son; el dominio extracelular, el transmembranal y un dominio C-terminal citoplásmico, que generalmente contiene al menos una copia del motivo Asn-Pro-X-Tyr (NPXY), el cual participa en la internalización del receptor. Se ha descrito, que las secuencias de cDNA de *LRP5* y *LRP6* tienen una identidad

de aproximadamente un 65%, alrededor de 5110 nucleótidos, mientras que las proteínas que tienen 1615 y 1613 aminoácidos, respectivamente, presentan un 71% de homología ⁽⁵³⁾.

De las tres variantes seleccionadas para el gen *LRP5*; la variante rs312009C/T, se localiza en el extremo 5' del gen, ~ 2900 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción ⁽⁵⁴⁾. Esta fue descrita previamente por Agueda et al. (2008), en un estudio de asociación con fenotipos de osteoporosis, donde se seleccionaron 24 polimorfismos en la región genómica de *LRP5*; entre otros, la variante rs312009C/T mostró asociación con densidad mineral ósea (DMO), en donde portadores del genotipo homocigoto TT mostraron un incremento de este parámetro. También realizaron un estudio *in silico* que reveló que dicha variante se encontraba en un posible sitio de unión de RUNX2, el cual es un factor de transcripción esencial en la diferenciación de osteoblastos. Posteriormente en 2011, el mismo grupo publicó un estudio donde evalúan el efecto funcional de la variante a través de ensayos de gen reportero que muestran diferencias alelo-específico en la actividad transcripcional, donde el alelo T es mejor transcriptor que el C ⁽⁵⁵⁾. Lo que sugiere que si hay mayor expresión del receptor de WNT10B (*LRP5*), esto podría favorecer la activación de la vía; lo cual por consecuencia inhibiría la diferenciación adipogénica, lo que podría explicar la asociación con protección para obesidad del alelo rs312009T (OR=0.54, IC95%0.30-0.99, P=0.043) observado en mujeres en el presente estudio.

Otra de las variantes analizadas en este estudio la rs4988300, se localiza en el intrón dos del gen *LRP5*, la cual, en 2006, en un análisis de asociación basado en familias realizado por el grupo de Guo et al. (2006), mostró asociación con obesidad, de hecho este fue el primer reporte en donde se documentó una asociación de SNPs en el gen *LRP5* con esta patología ⁽⁴²⁾. Posteriormente, diversos estudios han documentado su asociación con fenotipos óseos, incluidas diferencias en masa y geometría ósea ⁽⁵⁶⁾, densidad mineral ósea, riesgo para padecer osteoporosis y el riesgo de presentar fracturas ^(57,58). En los cuales el alelo menor se asocia a un incremento en DMO y por lo tanto protección a osteoporosis. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en éste estudio, en donde el alelo menor (T), se asocia con protección a obesidad en el grupo de mujeres (OR=0.64,

IC95%0.47-0.88, $P=0.006$), sugiriendo un incremento es el proceso de osteogénesis y una disminución en la adipogénesis.

Respecto a la otra variante analizada de este gen la rs3736228T/C, que es un SNP no sinónimo, se localiza dentro de la segunda repetición LDL de LRP5, el cual genera un cambio de una Alanina por una Valina en la posición 1330 de la proteína (*Ala1330Val*). Aunque la función de esta región en LRP5 no es clara, dominios similares en el receptor de LDL están implicados en la unión del ligando al receptor ⁽⁵⁹⁾. Por lo tanto, es muy posible que cambios de aminoácidos en las repeticiones de LDL, como el generado por esta variante no sinónima, tengan el potencial de alterar la función y señalización de la proteína. A pesar de que la conversión del aminoácido Alanina a Valina se considera químicamente como un cambio relativamente leve, estudios de conservación del aminoácido *1330Ala*, mostraron una conservación mínima de este residuo en la proteína a través de las especies, es muy importante resaltar que éste se localiza adyacente a una serie de aminoácidos altamente conservados, lo que no descarta que podría ser funcionalmente importante ⁽⁶⁰⁾. De hecho, apoyando lo anterior, se ha documentado en múltiples estudios que dicha variante se encuentra asociada con incremento en riesgo de fractura y disminución de DMO en individuos que portan el aminoácido *1330Val* ^(44,61,62). Sin embargo, a pesar de que la vía Wnt/ β -catenina se encuentra involucrada en la regulación tanto de los procesos de osteogénesis, así como de la adipogénesis, a la fecha no existe ningún reporte de asociación con obesidad o IMC con esta variante, pero dada su influencia en fenotipos relacionados con el metabolismo óseo, esta variante, podría también estar involucrada en la obesidad a través de la alteración del proceso de adipogénesis, modificando la función de LRP5. En este sentido, en 2006 van Meurs et al., evaluaron la asociación de varios haplotipos conformados por varios SNPs del gen *LRP5*, observando que únicamente aquellos que contenían a la variante *1330Val* se asociaron con una DMO disminuida en hombres. De la misma manera el grupo de Kiel et al. (2007), reportó una asociación significativa con disminución de DMO en hombres y además en un estudio funcional donde evaluaron diferentes haplotipos de cuatro variantes, incluido el SNP rs3736228, concluyeron que en presencia del alelo rs3736228T (*1330Val*), existía una disminución en la activación

de la vía, lo cual concuerda no sólo con las asociaciones descritas en el trabajo de Kiel y en otros estudios, como la asociación con disminución de DMO e incremento en el riesgo de fractura ^(60,63,64); sino que también con que, en presencia del mismo alelo, se observó un incremento significativo en el riesgo de padecer obesidad tipo I en hombres (OR=1.57, IC95%1.09-2.26, P=0.015).

Una posible explicación para la asociación dependiente de género observado para las tres variantes analizadas en este estudio del gen *LRP5*, podría ser la convergencia descrita, entre la señalización de Wnt/ β -catenina y el metabolismo del estrógeno ⁽⁶⁵⁾.

Por otro lado, a pesar de que estas tres variantes no mostraron un alto grado de desequilibrio de ligamiento, se observó que la segunda combinación más frecuente CGT (16%), que incluye a los alelos mayores de las variantes rs312009C/T y rs4988300G/T y el menor de la variante rs3736228C/T mostró asociación con riesgo de presentar obesidad en la población total (OR=1.33, IC95%1.04-1.62, P=0.015). Dado que en el análisis independiente de cada una de las variantes, los alelos menores de las dos primeras se asociaron con protección y el de la última con riesgo, se puede sugerir que en mestizos mexicanos, el riesgo asociado con este haplotipo está dado por el alelo menor (T) de la variante rs3736228. Cabe destacar que al estratificar a la población por género y realizar el análisis de haplotipos la asociación con riesgo se mantuvo para la misma combinación de alelos, únicamente para el grupo de los hombres (OR=1.64, IC95%1.10-2.47, P=0.046) lo cual sugiere que la asociación esté dada por la variante codificante *1330Val* y que apoya una posible influencia de ésta variante en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina por *LRP5*, dependiente del género.

Para el caso del gen *LRP6* se seleccionaron dos variantes (rs2302685(T/C) y rs2075241(C/G)); la primera, rs2302685(T/C), la cual es una variante codificante no sinónima, que se encuentra en el exón 14 del gen y genera el cambio de una Valina por una Isoleucina en la posición 1062 (Ile1062Val) de la proteína. Respecto a esta variante, Ferrari et al., (2006), reportaron que un alineamiento entre las secuencias completas de *LRP5* y *6* de ratón y de humano, así como el gen *Arrow*, que es su ortólogo en *Drosophila*, mostró que el aminoácido Ile-1062,

es un residuo altamente conservado durante la evolución, aunado a que se encuentra en una región codificante lo que sugiere que éste puede ser muy importante para el funcionamiento de la proteína ⁽⁶⁶⁾. Existen varios reportes donde se ha investigado su asociación con diferentes patologías y sus fenotipos asociados ^(44,67,68), como cambios en DMO así como con el riesgo de fractura ⁽⁶⁷⁾. Sin embargo en estos estudios, los resultados han sido controversiales en las diferentes poblaciones analizadas; de hecho en el primer reporte de asociación publicado en 2006 por van Meurs et al., se observó asociación de esta variante con riesgo de fractura, pero únicamente para el grupo masculino ⁽⁶⁰⁾, mientras que en 2011, Riancho et al., observó asociación con DMO, de la misma variante, pero solo en mujeres mayores de 50 años ⁽⁶⁹⁾. Es importante mencionar que a pesar de la importancia de LRP6 en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina, involucrada en la determinación de las células MSCs pluripotenciales, a la fecha no existen reportes de la asociación de variantes del gen *LRP6* con obesidad. Así, los resultados obtenidos en nuestro estudio, apoyan que existe una relación antagónica entre el encendido y apagado de la vía Wnt/ β -catenina en los procesos metabólicos como la osteogenesis y la adipogénesis, como lo muestra la asociación con riesgo de fractura de la variante rs2302685C previamente reportada ⁽⁶⁰⁾ y la asociación con protección al desarrollo de la obesidad bajo los modelos dominante (OR=0.63, IC95% 0.45-0.88, P=0.006) y aditivo (OR=0.68, IC95 %0.50-0.94, P=0.018), documentados para la misma variante en este estudio.

La otra variante analizada de gen *LRP6*; rs2075241C/G, es una variante no codificante, que se localiza en el intrón 15 del gen. El primer reporte en un estudio de asociación para esta variante fue en 2009, donde se investigó su asociación con colesterol LDL, obteniéndose resultados negativos para este análisis ⁽⁶⁸⁾. Posteriormente en 2015 el grupo de Harriott A. publicó un estudio de asociación de 14 variantes del gen *LRP6* con riesgo de infarto isquémico, entre las cuales se encontraba esta variante, la cual, si mostró asociación significativa con esta patología, siendo éste el primer reporte publicado de asociación con algún parámetro o patología ⁽⁷⁰⁾. En cuanto a los resultados obtenidos en éste estudio, aun cuando no se observó asociación significativa en el estudio de casos y

controles, en el análisis de regresión lineal con el parámetro de IMC como variable continua se observó una asociación significativa con un incremento en este parámetro (BETA=0.67, P=0.04). Por otro lado, dicha variante, también mostró asociación con incremento la presión arterial tanto sistólica (BETA=2.02, P=0.02) como diastólica (BETA=1.32, P=0.01), lo cual concuerda con reportes previos en donde se ha propuesto que la señalización de WNT se encuentra involucrada en la regulación de la presión arterial ⁽⁷¹⁾.

El análisis de haplotipos de las variantes del gen *LRP6*, no mostró un grado de desequilibrio de ligamiento fuerte entre éstas; sin embargo en el estudio de casos y controles, la combinación (GC) que contiene el alelo mayor de la variante rs2075241G y el alelo menor del SNP rs2302685C, mostró asociación estadísticamente significativa con protección (OR=0.71, IC95%0.52-0.98, P=0.03), lo cual concuerda con lo observado al analizar dichas variantes de manera individual en donde el alelo menor de la variante (rs2075241C) se asocia con incremento de IMC en el análisis de regresión lineal y el alelo menor de la segunda rs2302685 (C) con protección en el análisis de casos y controles. Dicho resultado, sugiere que la presencia de la combinación GC de las variantes rs2075241 y rs2302685 de este gen se asocia con protección para desarrollo de obesidad en población mestiza mexicana.

Finalmente, para el caso del gen *WNT10B*, el cual codifica para uno de los ligandos que activan la vía de señalización Wnt/ β -catenina, se seleccionó la variante rs833840, que se encuentra en la posición -607 de la región promotora del gen. En el 2010 Kim I. et al., fueron los primeros en reportar asociación entre variantes del gen *WNT10B* y parámetros de obesidad en población coreana. Este grupo, mediante secuenciación, identificó 6 variantes en desequilibrio de ligamiento, 4 de las cuales se localizan en la región promotora y de éstas, únicamente la variante -607G>C (rs833840) mostró una unión diferencial del factor nuclear en un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés). Además de una actividad promotora diferencial en un ensayo de gen reportero; lo que sugiere que éste, podría ser un SNP funcional que regula la actividad del promotor de *WNT10B*, por lo tanto, puede modificar la expresión del gen *WNT10B*. A partir de los datos obtenidos de este análisis, este grupo sólo

genotipificó dicha variante en su población de estudio conformada sólo por mujeres, el cual evidenció una asociación significativa en presencia del homocigoto CC, en donde se observa una disminución tanto de IMC, así como de la RCC (relación cintura-cadera), en comparación con los individuos homocigotos GG y los heterocigotos ⁽⁴¹⁾. Estos datos, concuerdan con los resultados obtenidos en éste estudio donde observamos una asociación significativa con riesgo al desarrollo de obesidad tipo 3 (OR=1.38, IC95%1.03-1.86, P=0.032), lo que está en concordancia con la inhibición de la expresión de WNT10B reportada para el alelo -607G, que inhibe la unión de los factores de transcripción, provocando la inhibición de la diferenciación de las células mesenquimales a adipocitos. Posterior al estudio de Kim et al., el grupo de Van Camp publicó dos reportes en donde se analizaron diferentes variantes de este gen, incluyendo el SNP rs833840. El primero en 2012, en el cual se incluyó población general de Bélgica y se evaluó la asociación con parámetros de obesidad ⁽⁷²⁾ y otro en 2013 en donde se incluyeron dos poblaciones, una de Bélgica y otra de Dinamarca, ambas de individuos de género masculino; en éste se analizó la asociación de variantes del gen *WNT10B*; tanto con DMO así como con parámetros de adiposidad ⁽⁷³⁾, pero en ninguno de los dos se observó asociación significativa con parámetros de obesidad o adiposidad. El hecho de que en ambos estudios de Van Camp et al. (2012, 2013) no se haya observado asociación significativa a diferencia de lo reportado por Kim et al., puede deberse a diferencias importantes en este tipo de estudios como la etnicidad de las poblaciones de estudio, ya que en el caso de Van Camp et al., ambas poblaciones son de origen Caucásico; mientras que para el caso de Kim et al. (2010) la población es de origen asiático. Por otro lado, otro factor importante que podría estar influyendo, son las diferencias de género y número de individuos en las poblaciones analizadas, ya que es uno de los estudios sólo se estudiaron mujeres y en los otros incluyeron población general en un estudio y para el otro sólo población de género masculino. Con base en lo anterior, el resultado de asociación obtenido en el presente estudio es una contribución importante dado el origen mestizo de la población analizada y porque la asociación es en población total y no solo en mujeres como lo reportado en el estudio de Kim et al. (2010).

No se observó interacción génica entre los genes analizados considerando las variantes incluidas en este estudio; sin embargo se pudo observar que existe una interacción de epistásis redundante entre las variantes rs4988300G/T y rs3736228C/T del gen *LRP5*, a pesar de que en el análisis de haplotipos no se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

Además de los análisis de asociación, en éste estudio también se compararon las frecuencias obtenidas de cada variante con las reportadas en la base de datos del Proyecto de 1000 Genomas para otras poblaciones continentales. En general, la muestra de población mestiza mexicana analizada en el estudio, mostró un comportamiento particular en cuanto a las frecuencias observadas, ya que se observaron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de los casos, excepto para la población MXL donde se observó que éstas dos poblaciones son muy similares y únicamente la variante rs2075241CG presentó diferencias al compararse con las poblaciones continentales mencionadas. Sin embargo, al comparar la frecuencia de ésta, con la reportada para el grupo de Latinos en la base de datos del ExAC, se observó que existe similitud entre estas dos poblaciones; lo cual podría sugerir que ésta variante tiene un origen africano ya que para la mayoría de las poblaciones su frecuencia es muy baja, pero se presenta en una frecuencia alta en los YRB (0.30), muy similar a lo observado en los mestizos mexicanos analizados en éste estudio (0.22) y a la población de Latinos del ExAC (0.21).

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se documenta una asociación del gen *LRP5* con obesidad, dependiente de género que podría explicarse por la convergencia entre la vía Wnt/ β -catenina y la de los estrógenos. Además, se reporta por primera vez, asociación de una variante no sinónima (rs2302685) en el gen *LPR6* con obesidad, la cual se localiza en una región altamente conservada del DNA, por lo que podría estar alterando la función de la proteína. Por otro lado, también se replicó la asociación con obesidad reportada en otras poblaciones de la variante analizada del gen *WNT10B*. Dado que es la primera vez que se reporta una asociación con obesidad para la mayoría de las variantes analizadas en este estudio, aun cuando la muestra analizada es estadísticamente representativa de nuestra población, es necesaria la validación de estos resultados en otra muestra representativa de población mexicana. Además, dada la participación en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina, de los tres genes incluidos en este estudio, sería de importancia analizar el efecto de estas variantes utilizando otras metodologías para corroborar su implicación en la adipogénesis. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que los genes analizados y por lo tanto la vía Wnt- β /catenina, tienen un papel muy relevante en la etiología de la obesidad a través de la regulación del proceso de adipogénesis. De hecho, varios reportes han considerado a los receptores LRP5 y 6 como posibles blancos terapéuticos, ya que mediante estudios funcionales se ha demostrado que pueden regular la activación de la vía Wnt- β /catenina ^(36,51). En este sentido, recientemente se ha publicado la aprobación de un anticuerpo monoclonal, inhibidor de esclerostina, un antagonista de LRP5, llamado Romosozumab, para el tratamiento de osteoporosis en pacientes con un alto riesgo de fractura ⁽⁷⁴⁾; lo cual es una evidencia contundente de que es posible regular la activación de la vía Wnt- β /catenina y que en un futuro se pueda aplicar en el tratamiento de la obesidad y patologías asociadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS: Organización Mundial de la Salud 2014
2. Kuller L, Wing R. Weight loss and mortality. *Ann Intern Med.* 1993 119:630-632.
3. Mutch DM, Clément K: Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet.* 2006; 2(12):1956-1963.
4. Barsh GS y Schwartz MW: Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 589-600.
5. Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan XM, Liu K, Woods SC y Zhang BB: Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med.* 2002; 8: 179–183.
6. Spiegelman BM, Flier, S: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; 104: 531–543.
7. ENSANUT 2016: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016
8. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;27:325–351
9. Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA* 1986;256:51–54
10. Farooqi IS y O'Rahilly S: New advances in the genetics of early onset obesity. *Int. J Obes.* 2005; 29: 1149–1152.
11. Fall, T, Ingelsson E: Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012; 382: 740-757.
12. Neel JV: Diabetes mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet.* 1962; 14:353-362.
13. Sellayah D, Cagampang FR, Cox RD: On the evolutionary origins of obesity: a new hypothesis. *Endocrinology.* 2014; 155: 1573-1588.
14. International Human Genome Mapping Consortium: A physical map of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):934-41.
15. International HapMap Consortium: The International HapMap Project. *Nature.* 2003 Dec 18;426(6968):789-96.
16. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurler ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010 Oct 28;467(7319):1061-73.

17. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91.
18. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, Hamamsy T, Lek M, Samocha KE, Cummings BB, Birnbaum D; The Exome Aggregation Consortium, Daly MJ, MacArthur DG. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D840-D845.
19. Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Pérusse L, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc*. 2006, 38:1863-1888.
20. Pérusse L. Genetics of human obesity: results from genetic epidemiology studies. *Ann Endocrinol* . 2000, Suppl 6:24-30.
21. Snyder EE, Walts B, Pérusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C: The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res*. 2004; 12:369-439.
22. Oh S, Lee J, Kwon MS, Weir B, Ha K, Park T. A novel method to identify high order gene-gene interactions in genome-wide association studies: gene-based MDR. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun 11;13 Suppl 9:S5
23. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet*. 2001 Jul;69(1):138-47. Epub 2001 Jun 11.
24. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C: Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. *BMC Cell Biol*. 2008, 13:9-11.
25. Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol*. 2017 Mar 16;7(2):635-674.

26. Hishida T, Naito K, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M: Crucial roles of D-type cyclins in the early stage of adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 370(2):289-294.
27. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006, 4(4):263-73.
28. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K: Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008, 9(1):R14.
29. Sharma G, Sharma AR, Seo EM, Nam JS. Genetic polymorphism in extracellular regulators of Wnt signaling pathway. *Biomed Res Int.* 2015 Apr 5;2015:847529.
30. Li HX, Luo X, Liu RX, Yang YJ, Yang GS. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Sep 10;291(1-2):116-24.
31. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004, 20:781-810.
32. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jan;20(1):16-24.
33. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000 Aug 11;289(5481):950-3.
34. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA: Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2002; 277(34):30998-1004.
35. Wright WS, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, Chiang SH, Prestwich TC, Gress C, Burant CF, Susulic VS, MacDougald OA. Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes.* 2007; 56(2):295-303.
36. Loh NY, Neville MJ, Marinou K, Hardcastle SA, Fielding BA, Duncan EL, McCarthy MI, Tobias JH, Gregson CL, Karpe F, Christodoulides C. LRP5 Regulates Human Body Fat Distribution by Modulating Adipose Progenitor Biology in a Dose- and Depot-Specific Fashion. *Cell Metab.* 2015; 21(2):262-72.
37. Liu W, Singh R, Choi CS, Lee HY, Keramati A, Samuel VT, Lifton RP, Shulman GI, Mani A: Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 6 (LRP6) Regulates Body Fat and Glucose Homeostasis by Modulating Nutrient Sensing Pathways and Mitochondrial Energy

- Expenditure. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011. 287(10): 7213-7223.
38. Kang S, Bajnok L, Longo KA, Petersen RK, Hansen JB, Kristiansen K y MacDougald OA: Effects of Wnt Signaling on Brown Adipocyte Differentiation and Metabolism Mediated by PGC-1 α . *Mol Cell Biol*. 2005. 25(4): 1272–1282.
 39. Song K, Wang S, Mani M, Mani A: Wnt signaling, de novo lipogenesis, adipogenesis and ectopic fat. *Oncotarget*. 2014; 5(22):11000-3.
 40. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2007;282:14515–24.
 41. Kim IC, Cha MH, Kim DM, Lee H, Moon JS, Choi SM, Kim KS, Yoon Y. A functional promoter polymorphism -607G>C of WNT10B is associated with abdominal fat in Korean female subjects. *J Nutr Biochem*. 2011 Mar;22(3):252-8.
 42. Guo YF, Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Guo Y, Wang W, Yang TL, Recker RR, Deng HW. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with obesity phenotypes in a large family-based association study. *J Med Genet*. 2006 Oct;43(10):798-803.
 43. Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, Eisman J, Jones G, Nicholson G, Prince R, Seeman E, Thomas G, Wass JA, Brown MA. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res*. 2008 Apr;23(4):499-506.
 44. Xu JA, Olmos JM, Pineda B, García-Ibarbia C, Pérez-Núñez MI, Nan DN, Velasco J, Cano A, García-Pérez MA, Zarrabeitia MT, González-Macías J. Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol*.
 45. Blakemore AI, Froguel P. Investigation of Mendelian forms of obesity holds out the prospect of personalized medicine. *Ann N Y Acad Sci*. 2010,1214:180-189.
 46. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004, 131:1663-77.
 47. Spielman RS y Ewens WJ: The TDT and Other Family-Based Tests for Linkage Disequilibrium and Association. *Am. J. Hum. Genet*. 1996, 59:983-989.

48. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S: Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009, 5(8):442-447.
49. Den Hoed M, Ekelund U, Brage S, Grontved A, Zhao J et al: Genetic Susceptibility to Obesity and Related Traits in Childhood and Adolescence. *Diabetes*. 2010; 59: 2980-2988.
50. Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, Opp MR, MacDougald OA. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35503-9.
51. Peröbner I, Karow M, Jochum M, Neth P. LRP6 mediates Wnt/ β -catenin signaling and regulates adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Nov;44(11):1970-82.
52. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets*. 2009 May;13(5):593-603.
53. Brown SD, Twells RC, Hey PJ, Cox RD, Levy ER, Soderman AR, Metzker ML, Caskey CT, Todd JA, Hess JF. Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 30;248(3):879-88.
54. Agueda L, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Ciria M, Saló G, Carreras R, Nogués X, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Grinberg D, Balcells S. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2008 Dec;23(12):1954-63.
55. Agueda L, Velázquez-Cruz R, Urreiziti R, Yoskovitz G, Sarrión P, Jurado S, Güerri R, Garcia-Giralt N, Nogués X, Mellibovsky L, Díez-Pérez A, Marie PJ, Balcells S, Grinberg D. Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J Bone Miner Res*. 2011 May;26(5):1133-44.
56. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*. 2007 Sep 19;8 Suppl 1:S14.
57. Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res*. 2006 Nov;21(11):1678-95.

58. Horváth P, Balla B, Kósa JP, Tóbiás B, Szili B, Kirschner G, Győri G, Kató K, Lakatos P, Takács I. Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2016 Jan;34(1):79-85.
59. Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem.* 1989 Dec 25;264(36):21682-8.
60. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hugens W, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res.* 2006 Jan;21(1):141-50.
61. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008 May 3;371(9623):1505-12.
62. Urano T, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S. A1330V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decreases Wnt signaling and affects the total body bone mineral density in Japanese women. *Endocr J.* 2009;56(4):625-31.
63. Correa-Rodríguez M, Schmidt-RioValle J, Rueda-Medina B. The rs3736228 polymorphism in the LRP5 gene is associated with calcaneal ultrasound parameter but not with body composition in a cohort of young Caucasian adults. *J Bone Miner Metab.* 2017 Nov;35(6):694-700.
64. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, Herbert AG, Dupuis J. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone.* 2007 Mar;40(3):587-96.
65. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S. Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):40255-8.
66. De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Sáez K, Henríquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and

- late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 29;104(22):9434-9.
67. Xu Y, Gong W, Peng J, Wang H, Huang J, Ding H, Wang DW. Functional analysis LRP6 novel mutations in patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 2014 Jan 10;9(1):e84345.
68. Tomaszewski M, Charchar FJ, Barnes T, Gawron-Kiszka M, Sedkowska A, Podolecka E, Kowalczyk J, Rathbone W, Kalarus Z, Grzeszczak W, Goodall AH, Samani NJ, Zukowska-Szczechowska E. A common variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 6 gene (LRP6) is associated with LDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Sep;29(9):1316-21.
69. Riancho JA, Olmos JM, Pineda B, García-Ibarbia C, Pérez-Núñez MI, Nan DN, Velasco J, Cano A, García-Pérez MA, Zarrabeitia MT, González-Macías J. Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol*. 2011 Jan;164(1):123-31.
70. Harriott AM, Heckman MG, Rayaprolu S, Soto-Ortolaza AI, Diehl NN, Kanekiyo T, Liu CC, Bu G, Malik R; METASTROKE Consortium, Cole JW, Meschia JF, Ross OA. Low density lipoprotein receptor related protein 1 and 6 gene variants and ischaemic stroke risk. *Eur J Neurol*. 2015 Aug;22(8):1235-41.
71. Cheng PW, Chen YY, Cheng WH, Lu PJ, Chen HH, Chen BR, Yeh TC, Sun GC, Hsiao M, Tseng CJ. Wnt Signaling Regulates Blood Pressure by Downregulating a GSK-3 β -Mediated Pathway to Enhance Insulin Signaling in the Central Nervous System. *Diabetes*. 2015 Oct;64(10):3413-24.
72. Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Verrijken A, Van Gaal LF, Van Hul W. Genetic association between WNT10B polymorphisms and obesity in a Belgian case-control population is restricted to males. *Mol Genet Metab*. 2012 Mar;105(3):489-93.
73. Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Boudin E, Nielsen TL, Andersen M, Roef G, Taes Y, Brixen K, Van Hul W. Genetic association study of WNT10B polymorphisms with BMD and adiposity parameters in Danish and Belgian males. *Endocrine*. 2013 Aug;44(1):247-54.
74. Markham A. Romosozumab: First Global Approval. *Drugs*. 2019 Mar;79(4):471-476. doi: 10.1007/s40265-019-01072-6.