



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

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

**ASOCIACIÓN GENÉTICA E INTERACCIÓN GEN-GEN ENTRE LOS
POLIMORFISMOS DE *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* Y *ACVR1* CON EL DESARROLLO
DE OSTEOARTRITIS PRIMARIA DE RODILLA EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

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

**PRESENTA:
MATVEY SOSA ARELLANO**

**TUTOR
D. en C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Página dejada en blanco a propósito



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

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

**ASOCIACIÓN GENÉTICA E INTERACCIÓN GEN-GEN ENTRE LOS
POLIMORFISMOS DE *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* Y *ACVR1* CON EL DESARROLLO
DE OSTEOARTRITIS PRIMARIA DE RODILLA EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

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

**PRESENTA:
MATVEY SOSA ARELLANO**

**TUTOR
D. en C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2022

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo y comprensión constante e incondicional. En especial, a mi esposa Delisle y mi hija Calíope quienes estuvieron a mi lado en las buenas, las malas y las peores, durante todo este trayecto. Las amo y nunca podré agradecerles lo suficiente.

AGRADECIMIENTOS

Durante esta investigación se recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca nacional de doctorado número 438437 (Número de registro del becario 289771, CVU 385796).

Un agradecimiento especial a todas las personas que participaron dando su consentimiento para participar en el proyecto.

También, le agradezco al Dr. Antonio Miranda Duarte por todo su apoyo y confianza al permitirme colaborar en la línea investigación que desarrolla de forma tan destacada. Para mí ha sido una experiencia muy enriquecedora el haber colaborado con usted durante este tiempo.

Así mismo, a los Dres. Juan Carlos Zenteno Ruiz y Alberto Hidalgo Bravo, miembros de mi comité tutorial, por su orientación y seguimiento durante el desarrollo de esta de investigación.

A la Maestra Norma Celia González Huerta, le agradezco infinitamente todo su apoyo en el laboratorio de genética y biología molecular.

Al Dr. Eugenio Morales Hernández por permitirnos llevar a cabo esta investigación en colaboración con el servicio de rayos X.

También un agradecimiento y reconocimiento particular al personal del servicio de radiología del Instituto Nacional de Rehabilitación, quienes gracias a su trabajo se pudo llevar a cabo esta investigación: Adriana, Mónica, David, Israel, Pavel, Mike, Teacher (QEPD), Ray, Junior, Aldo, Richard, Felipe, Edith, Gabriela, Dra. Franco, Dra. Estrada, Alejandro, además de las compañeras y compañeros que pude no haber mencionado por falta de espacio y de memoria.

RESUMEN

Introducción La epistasis participa en la patogénesis de las enfermedades complejas como la osteoartritis (OA) de rodilla y los genes *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* participan en procesos que están involucrados con el desarrollo de esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue determinar la asociación de las variantes de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1*, *ACVR1*, y sus interacciones, con el desarrollo de OA primaria de rodilla en pacientes mexicanos.

Metodología Estudio de casos y controles no pareados. Casos: sujetos con radiografía de rodilla grado 2 o mayor en la escala Kellgren-Lawrence; controles: grado 0 o 1. Se genotipificaron las variantes de un solo nucleótido, rs2167270 (*LEP*), rs2010963 (*VEGF*), rs25648 (*VEGF*), rs1676486 (*COL11A1*) y rs3753841 (*COL11A1*), rs1146031 (*ACVR1*) y rs2227861 (*ACVR1*) con PCR en tiempo real. Se analizaron los modelos de asociación genética dominante, codominante, recesiva y aditiva. La interacción gen-gen se evaluó con el algoritmo reducción dimensional múltiple (MDR). Se construyeron los haplotipos correspondientes y se evaluó su asociación. Así mismo, se analizaron las asociaciones entre los diferentes grados radiológicos en la muestra total.

Resultados Se analizó la muestra parcial de 107 casos y 187 controles; y una muestra total de 380 casos y 499 controles. En la muestra parcial, no se encontró asociación individual de rs2167270 y rs2010963 con OA de rodilla, pero se encontró un efecto de epistasis sinérgica entre ellas (Precisión de entrenamiento 0.57, precisión de prueba 0.52, validación cruzada 10/10, GI 0.43%, RM 1.75 IC95% 1.09-3.07). En la muestra total, No se encontró asociación de rs25648, rs1676486, rs3753841, y rs1146031 con OA de rodilla, pero el genotipo GA y el alelo A de rs3753841 se asociaron significativamente a OA de rodilla leve y moderada, respectivamente [RM= 0.62 IC95% (0.41-0.96)]. Los haplotipos de rs1676486 y rs3753841 no se asociaron a OA de rodilla. El modelo de interacción rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648 (Precisión entrenamiento 0.57, precisión de prueba 0.49, validación cruzada 10/10, RM 1.35 IC95% 1.00-1.84) mostró efectos redundantes e independientes ($GI \leq 0$) sobre el fenotipo OA de rodilla.

Conclusiones Las variantes rs2167270 y rs2010963 no se asocian individualmente con OA de rodilla. Existe epistasis entre rs2167270 y rs2010963 asociada con OA primaria de rodilla. En la muestra total, rs1146031, rs1676486, y rs25648, o los haplotipos de rs1676486 y rs3753841, se asociaron a OA de rodilla. El genotipo GA de rs3753841 se asocia con OA leve, y el alelo A con OA moderada. El modelo de interacción rs1146031, rs1676486, rs3753841 y rs25648 presenta efectos independientes y/o redundantes sobre la OA de rodilla.

Palabras clave: Epistasis, Osteoartritis de rodilla, Reducción dimensional múltiple, Asociación genética

ABSTRACT

Introduction Epistasis is a phenomenon that participate in the pathogenesis of complex disease, including knee osteoarthritis (OA). *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* and *ACVR1* genes participate in articular damage pathways. The aim of this study was to determine the association of genetic variants of these genes and their interactions with the development of primary knee OA in the Mexican population.

Methods A non-matched case-control study was designed. Cases were subjects with radiographs of the knee graded 2 or more according to Kellgren-Lawrence OA grading scale; controls were graded 0 or 1. The single nucleotide variants rs2167270 (*LEP*), rs2010963 (*VEGF*), rs25648 (*VEGF*), rs1676486 (*COL11A1*) rs3753841 (*COL11A1*), rs1146031 (*ACVR1*) and rs2227861 (*ACVR1*) were genotyped using real time PCR. The dominant, codominant, recessive and additive genetic association models were assessed. Gen-gen interaction was evaluated using Multiple Dimensionality Reduction (MDR) method. The association of the corresponding haplotypes was also evaluate. Additionally, genetic association was evaluated in different OA degrees of severity in the total sample.

Results Analysis of a partial sample composed by 107 cases and 187 controls showed no individual association of rs2167270 and rs2010963 with OA; however, epistasis was found between these variants associated with primary knee OA development (Training accuracy 0.57, testing accuracy 0.52, Cross-validation 10/10, GI 0.43%, OR 1.75 IC95% 1.09-3.07). In the total sample (380 cases and 499 control subjects) there was no individual association of rs25648, rs1676486, rs3753841, and rs1146031 with OA. Neither the haplotypes from rs1676486 rs3753841 were associated. However, when the sample was stratified according to radiologic grade, GA genotype and A allele of rs3753841 were associated to mild and severe knee OA, respectively [OR= 0.62 IC95% (0.41-0.96)]. The interaction model rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648 (Training accuracy 0.57, Testing accuracy 0.49, Cross-validation 10/10, OR 1.35 IC95% 1.00-1.84) showed redundant and independent effects over knee OA.

Conclusions Genetic variants, rs2167270 and rs2010963, are not individually associated to knee OA, but there is a significant epistasis among those variants associated with primary knee OA. There is no association of rs1146031, rs1676486, y rs25648 with knee OA in the total sample; haplotypes from *COL11A1* variants weren't associated to OA; while, rs3753841 seems to be associated to mild and moderate radiographic knee OA. The interaction model between rs1146031, rs1676486, rs3753841 and rs25648 have independent and redundant effects over knee OA development.

Key words: Epistasis, knee osteoarthritis, Multiple Dimensionality Reduction, Genetic association

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	6
CONTENIDO DE TABLAS	8
CONTENIDO DE FIGURAS	9
MARCO TEÓRICO	10
Introducción	10
Epidemiología de OA	10
Clasificación	11
Diagnóstico	12
Fisiopatogenia	12
Organización del cartílago	12
Metabolismo del CA	14
Retroalimentación entre factores anabólicos y catabólicos en el cartílago	17
Daño articular y OA	17
Factores de riesgo	19
Factores genéticos	20
Los genes <i>LEP</i> , <i>VEGF</i> , <i>COL11A1</i> y <i>ACVR1</i> en el desarrollo de OA	21
Gen <i>LEP</i>	22
Gen <i>VEGF</i>	24
Gen <i>COL11A1</i>	26
Gen <i>ACVR1</i>	28
Epistasia	30
Estudios de epistasia en OA	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	36
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Diseño	37
Población	38
Criterios de selección de la muestra	38
Criterios de inclusión de los casos:	38
Criterios de exclusión de los casos:	38
Criterios de inclusión de los controles:	38
Criterios de exclusión de los controles:	39
Definición de las variables	39

Tamaño de muestra	39
Análisis estadístico.....	40
Aspectos éticos y de bioseguridad	43
Descripción de los procedimientos	44
Clasificación radiológica de los sujetos de estudio	44
Genotipificación de los individuos	45
RESULTADOS	53
Resultados de la muestra parcial.....	53
Análisis de asociación de rs2167270 (<i>LEP</i>), rs2010963 (<i>VEGF</i>), y rs1676486 (<i>COL11A1</i>) con OA de rodilla	53
Análisis de epistasis entre rs2167270 y rs2010963 con MDR.....	60
Resultados de la muestra total	64
Análisis de asociación de rs1676486 (<i>COL11A1</i>), rs3753841 (<i>COL11A1</i>), rs1146031 (<i>ACVR1</i>) y rs2227861 (<i>ACVR1</i>) rs25648 (<i>VEGF</i>) con OA de rodilla	64
Análisis de asociación haplotipos de las variantes de <i>COL11A1</i> con Haploview	74
Análisis de epistasis entre rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648 con MDR.....	77
DISCUSIÓN.....	82
Muestra parcial.....	82
No se encontró asociación individual entre las variantes de <i>LEP</i> y <i>VEGF</i> con OA de rodilla .	82
Las variantes rs2167270 (<i>LEP</i>) y rs2010963 (<i>VEGF</i>) presentan epistasis que se asocia al desarrollo de OA de rodilla	84
Muestra total	85
La variante genética rs3753841 se encuentra asociada con OA de rodilla de acuerdo al grado de severidad en la escala radiológica de Kellgren y Lawrence	85
Se encontró un modelo de interacción entre rs1146031 (<i>ACVR1</i>), rs25648 (<i>VEGF</i>), rs3753841 y rs1676486 (<i>COL11A1</i>) con efectos redundantes o independientes sobre OA de rodilla	87
Evidencia de epistasis e interacción genética de las vías en las que participan los genes <i>LEP</i> , <i>VEGF</i> , <i>COL11A1</i> y <i>ACVR1</i> , en otros estudios de interacción gen-gen con OA	89
Fortalezas y limitaciones del estudio	90
CONCLUSIONES.....	93
ABREVIATURAS.....	94
REFERENCIAS	97
ANEXOS.....	118
Anexo I: Consentimiento informado.....	118
Anexo II: Documentos y formato de autoevaluación.	120
Anexo III: Formato de recolección de datos.	122
Anexo IV: Formato de evaluación radiológica.	126

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.	Definición operativa de las variables	47
Tabla 2.	Características de las variantes genéticas analizadas en nuestro estudio.....	51
Tabla 3.	Características de la muestra parcial del estudio	55
Tabla 4.	Distribución de las frecuencias alélicas los polimorfismos rs2167270 (<i>LEP</i>), rs2010963 (<i>VEGF</i>) y rs1676486 (<i>COL11A1</i>) con OA de rodilla en la población Mexicana	57
Tabla 5.	Asociación de los genotipos de rs2167270 (<i>LEP</i>), rs2010963 (<i>VEGF</i>) y rs1676486 (<i>COL11A1</i>) con OA de rodilla en la población Mexicana.....	58
Tabla 6.	Mejor modelo de interacción entre rs2167270 (<i>LEP</i>) y rs2010963 (<i>VEGF</i>) asociado con OA de rodilla en el análisis con MDR.....	61
Tabla 7.	Características demográficas de la muestra total estudiada	65
Tabla 8.	Distribución de las frecuencias alélicas los polimorfismos rs1676486 (<i>COL11A1</i>), rs3753841 (<i>COL11A1</i>), rs1146031 (<i>ACVR1</i>) rs2227861 (<i>ACVR1</i>), y rs25648 (<i>VEGF</i>) con OA de rodilla	67
Tabla 9.	Asociación de los genotipos de rs1676486 (<i>COL11A1</i>), rs3753841 (<i>COL11A1</i>), rs1146031 (<i>ACVR1</i>) rs2227861 (<i>ACVR1</i>), y rs25648 (<i>VEGF</i>) con OA de rodilla en la población Mexicana	68
Tabla 10.	Distribución de las frecuencias alélicas de rs1676486 (<i>COL11A1</i>), rs3753841 (<i>COL11A1</i>), rs1146031 (<i>ACVR1</i>), rs2227861 (<i>ACVR1</i>) y rs25648 (<i>ACVR1</i>) en los subgrupos, OA de rodilla leve, moderada y severa	71
Tabla 11.	Asociación de los genotipos de rs1676486 (<i>COL11A1</i>), rs3753841 (<i>COL11A1</i>), rs1146031 (<i>ACVR1</i>), rs2227861 (<i>ACVR1</i>) y rs25648 (<i>ACVR1</i>) con OA radiológica leve, moderada y severa	72
Tabla 12.	Frecuencia de los haplotipos formados por rs1676486 y rs3753841 (<i>COL11A1</i>) y su asociación con OA de rodilla en la población mexicana	75
Tabla 13.	Mejor modelo de interacción entre rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648 en MDR	78

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de los pasos generales del método MDR (traducido y adaptado de Motsinger y Ritchie, 2005).....	52
Figura 2. Tabla de celdas de distribución de frecuencias genotípicas entre casos y controles de la muestra parcial, en el análisis con MDR.	62
Figura 3. Análisis gráfico del modelo de interacción rs2167270/rs2010963 con OA de rodilla. ..	63
Figura 4. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de <i>COL11A1</i>	76
Figura 5. Tabla de celdas de distribución de frecuencias genotípicas entre casos y controles de la muestra total, en el análisis con MDR.	79
Figura 6. Análisis gráfico del modelo de interacción rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648 con OA de rodilla.	80

MARCO TEÓRICO

Introducción

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más común en el mundo. Puede afectar cualquier articulación sinovial, pero se presenta con mayor frecuencia en rodilla, cadera, manos y columna. Se caracteriza por degeneración del cartílago articular (CA), remodelación de hueso subcondral (HS) y sinovitis leve; esto desencadena dolor, crepitación, rigidez articular y discapacidad (Scott and Kowalczyk, 2007). Esta enfermedad es causada por una pérdida progresiva de la capacidad celular para responder ante un desbalance metabólico a favor del catabolismo en los tejidos articulares. La OA es una patología de etiología multifactorial, en la cual las variantes genéticas y otros factores hereditarios tienen gran influencia en la variabilidad de su presentación en la población. La epistasis es un fenómeno en el cual las variantes genéticas interactúan para producir un efecto en el fenotipo, es uno de los mecanismos mediante el cual las variantes genéticas relacionadas con las vías de daño articular ejercen su efecto en OA.

Epidemiología de OA

La OA es una enfermedad que se presenta en todos los países, es más frecuente en mujeres y su prevalencia aumenta con la edad. La incidencia de la OA de rodilla es de 240 casos por 100 000 años-persona aumentando después de los 50 años, yendo desde 0/100 000 años-persona entre los 20 y 49 años, hasta 583/100 000 años-persona en mujeres y 445/100 000 años-persona en hombres (Oliveria *et al.*, 1995). Además, otros estudios han reportado que el riesgo de la población en general de presentar OA en el transcurso de la vida es de aproximadamente 44.7%, mismo que incrementa en personas con obesidad o antecedente de lesión de rodilla (Murphy *et al.*, 2008). Los estudios de Felson y Jordan también reportan un aumento en la prevalencia de OA relacionado con la edad. En el estudio de Framingham se reportó una prevalencia de 27% en sujetos menores de 70 años a 44% en personas mayores de 80 años. Mientras que el estudio del condado de Johnson, que tenía una muestra representativa del 32.6% de personas afroamericanas, reportó un incremento en la

prevalencia desde 14.9% en personas de 45 a 54 años de edad hasta 49.9% en mayores de 75 años (Felson *et al.*, 1987; Jordan *et al.*, 2007).

La OA de rodilla es uno de los motivos de consulta por discapacidad más frecuentes en todo el mundo. Según el Global Burden of Disease Study, la OA de rodilla y cadera fue calificada en el número 11 de 291 enfermedades estudiadas que contribuyen a la discapacidad global. Además, reportó una prevalencia de 3.8% en la población general y, se observó un incremento en los años de vida que se vive con discapacidad (Cross *et al.*, 2014). En México se ha reportado una prevalencia de 10.9% en mujeres y 7.3% en hombres en distintos estados de la república; la prevalencia por edad fue de 4.8% en menores de 45 años, 14% en individuos entre 46 y 65 años, y de 21.4% en mayores de 65 años (Rodríguez-Amado *et al.*, 2016). En 1998 se reportó como la segunda causa de morbilidad (Borges-Yañez and Gómez-Dantés, 1998) y en instituciones de salud como el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) la OA representa el 14.8% de la consulta externa, siendo la rodilla la articulación más afectada en un 57.6% de los casos (De Pavio-Mota, Larios-González and Briceño-Cortés, 2005).

Clasificación

La OA se puede clasificar como primaria o secundaria. Aunque ambas resultan de la disrupción provocada por un desbalance metabólico influenciado por fuerzas mecánicas y sistemas de regulación endocrina, paracrina y autocrina a nivel celular que ocasiona un recambio de tejido articular; su diferencia radica en el conocimiento de una causa evidente de la OA. Podemos considerar a la OA primaria como una condición idiopática que se desarrolla en una articulación sin daño previo y en la ausencia de un evento desencadenante. Este tipo de OA tiene un componente genético importante, pero también se ha asociado a factores hormonales como la deficiencia de estrógenos en el tejido articular y los cambios relacionados con la edad. Por otro lado, se considera OA secundaria cuando se conoce una condición predisponente bien reconocida que justifique el diagnóstico, por ejemplo, procesos inflamatorios, mecánicos o quirúrgicos, displasias óseas, entre otros (Altman *et al.*, 1986; Herrero-Beaumont *et al.*, 2009).

Diagnóstico

El diagnóstico de la OA es clínico y radiológico. Los criterios radiológicos propuestos por Kellgren y Lawrence en 1957 siguen vigentes. Estos se basan principalmente en la presencia de osteofitos, estrechamiento del espacio articular, esclerosis del HS, y deformación terminal de la articulación, entre otros criterios. La OA se clasifica en 5 grados que van desde ausente (0), hasta grave (4) (Los criterios se explican con más detalle en la sección de Metodología de este trabajo) (Kellgren and Lawrence, 1957). El uso de estos criterios radiológicos tiene la ventaja de que permite el diagnóstico de OA incluso en pacientes que no han presentado sintomatología clínica como lo han mostrado algunos estudios epidemiológicos (Jordan *et al.*, 2007). Además, son ampliamente usados para la investigación y la toma de decisiones clínico-quirúrgicas (Kohn, Sassoon and Fernando, 2016).

Por otro lado, el Colegio Americano de Reumatología desarrolló sus criterios para la clasificación y el reporte de OA con el objetivo inicial de estandarizar y clarificar la definición clínica de OA. Estos criterios se fundamentan en la identificación de subtipos de OA combinando el uso de datos clínicos (dolor articular, edad, rigidez articular, crepitación, dolor a la palpación ósea, crecimiento óseo), radiográficos (osteofitos) y de laboratorio (tasa de sedimentación eritrocitaria, factor reumatoide, y datos de OA en el líquido sinovial). De esta manera, clasifica a la OA como clínica, clínica-radiográfica y clínica-laboratorial, donde el dolor óseo es considerado el dato cardinal en los tres subtipos (Altman *et al.*, 1986).

Fisiopatogenia

Organización del cartílago

El CA se encuentra conformado principalmente por agua (70%), colágena tipo II (20%) y proteoglicanos (agrecano y condroitina) que conforman una matriz extracelular (MEC) producida por los condrocitos, que están distribuidos en diferentes capas y cuya principal función es la de distribuir la carga mecánica y disminuir la fricción al movimiento (Hashimoto *et al.*, 2008). La MEC es una matriz proteica compuesta por una red de fibrillas de colágeno tipos II y XI a las que se adhiere en su superficie una cadena de colágena tipo IX que interactúa y/o sostiene otros componentes de la

MEC como el Agrecano, y otros proteoglicanos (Hashimoto *et al.*, 2008). Las colágenas II, IX y XI forman parte de una súper-familia de proteínas que tienen expresión en muchos tejidos y en su mayoría forman estructuras fibrilares extracelulares similares a redes. La colágena II es la más abundante en el tejido cartilaginoso. Estas proteínas tienen dominios con secuencia Gly-x-y que forma pliegues para formar una estructura trihelicoidal. La triple hélice de estas proteínas está conformada por 3 cadenas de polipéptidos enroscados en sentido izquierdo. Su biosíntesis inicia con la expresión de un precursor llamado pro-colágena, el cual será hidroxilado en los aminoácidos “x” y “y” de la secuencia Gly-x-y que generalmente están representados por prolina e hidroxiprolina; son estas modificaciones las que le permiten polimerizarse y darle estabilidad a la estructura trimérica (Prockop and Kivirikko, 1995). Por otra parte, el agrecano está compuesto por numerosas cadenas de condroitín sulfato (CS) y forma agregados gigantes con el hialuronano, al que hidrata hasta hincharlo debido a la carga negativa del CS que absorben grandes cantidades de agua. Este agregado hinchado se atrapa en las redes tejidas de colágena II y es esta estructura compuesta la que le confiere a la MEC del cartílago su fuerza compresiva y capacidad de absorber el impacto mecánico (Mead and Apte, 2018).

A su vez, las capas en las que se distribuyen los condrocitos tienen distintas características entre sí, incluyendo las condiciones de oxígeno en las que llevan a cabo sus funciones metabólicas y la composición de la matriz extracelular. Los condrocitos funcionan en condiciones de baja tensión de oxígeno sobre todo en las capas más profundas del cartílago donde presentan un aumento en la expresión del factor inducido por hipoxia tipo 1 α (HIF1 α) el cual regula distintos genes involucrados con el anabolismo y catabolismo, incluyendo al factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) y al gen *SRY*-box 9 (*SOX9*). La hipoxia regula a genes como el de la proteína inducible por arresto celular y daño a DNA (*GADD*) 45B, que actúa como un factor de supervivencia en los condrocitos normales. Conforme los condrocitos envejecen aumenta el estrés metabólico al que se exponen, lo que altera su estructura y la de la colágena y proteoglicanos a su alrededor. También aumenta el entrecruzamiento de las fibras de colágeno por la acumulación de productos terminales de la

glicación en la MEC y dentro del condrocito, en el aparato de Golgi y retículo endoplásmico, lo que disminuye su capacidad anabólica y de supervivencia (Goldring and Goldring, 2010).

Justo debajo del CA se encuentra una zona de hueso epifisiario llamado HS que está compuesto por una placa que por debajo tiene hueso trabecular y subarticular. La placa de HS comprende la capa más profunda del CA calcificado y una capa delgada de hueso cortical. El HS ofrece una importante protección a la articulación absorbiendo el daño mecánico al movimiento, puede atenuar hasta un 30% la carga articular y provee una base mecánica para el cartílago articular. Por otro lado, se ha demostrado que estos tejidos mantienen una constante comunicación, incluyendo canales de comunicación entre los dos tejidos a través de señales químicas, por lo que son considerados una unidad funcional articular (Castañeda *et al.*, 2012).

Metabolismo del CA

El balance entre las señales anabólicas y catabólicas mantiene la homeostasis del CA. Estos procesos se regulan entre sí compitiendo para mantener un balance en la producción y degradación de la MEC. Dentro de las vías anabólicas destacan las vías de señalización reguladas por el factor de crecimiento transformante B (TGFB), proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), factores de crecimiento similares a insulina (IGF) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Hashimoto *et al.*, 2008). El TGFB y las BMP pertenecen a la súper-familia TGF β , quienes activan señales de transducción intracelular del complejo de las proteínas Smad (por las siglas en inglés *Mothers Against Decantaplegic homolog*), a través de su unión a receptores tipo proteína-cinasa que fosforilan a Smad-1, -2 y -3, activándolas y favoreciendo la formación de un complejo con Smad-4 que se transloca al núcleo regulando los genes que responden a la vía (Philip, 2012). Mientras tanto, los IGF son sintetizados en el hígado y estimulados por la hormona del crecimiento, también se unen a un receptor de membrana tipo tirosina-cinasa para ejecutar sus funciones. Su accesibilidad al receptor está regulada por proteínas de unión a IGF extracelulares (IGFBP), las cuales son secretadas por el condrocito y otros tejidos articulares (De Ceuninck *et al.*, 2004). Por su lado, los FGF son 18 polipéptidos organizados en 6 subfamilias, FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9 y FGF19. Excepto por la subfamilia FGF19, quienes actúan como si fueran hormonas endocrinas, las FGF

actúan de forma paracrina, pero todas actúan sobre alguno de los 7 receptores tirosina-cinasa denominados FGFR 1-4 (del 1 al 3 con variantes b y c). El heparán sulfato, un glucosaminoglicano sulfatado que se encuentra en la membrana celular y la MEC de todos los tejidos animales, es necesario para la unión de los FGF paracrinicos a su receptor y favorece una polimerización con otros complejos FGF:FGFR en una relación 2:2, sin embargo, los péptidos secretados de forma endocrina tienen poca afinidad y usan a las proteínas transmembrana α -Klotho y β -Klotho como correceptores para favorecer su unión con FGRFR y su dimerización al formar complejos ternarios FGF-FGFRB-Klotho. Una vez unidos al receptor, se estimula la activación directa de dos sustratos intracelulares conocidos, la Fosfolipasa C γ (PLC γ , también conocida como FRS1) y el sustrato de FGFR 2 α (FRS2 α). Después de su fosforilación por el receptor FGFR, estos sustratos disparan la activación de múltiples vías metabólicas, incluyendo las vías de la proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa activada-mitógena-RAS (MAPK), fosfoinositida 3 cinasa (PIK3)-proteína cinasa B (AKT), y la vía de proteína de control de división celular (CDC42)/sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras 1 (RAC1); de esta manera ejercen control sobre el metabolismo celular, proliferación, crecimiento, diferenciación, migración, quimiotaxis, apoptosis y senescencia (Xie *et al.*, 2020). Estas proteínas estimulan la síntesis de colágena II y proteoglicanos a través de las vías en las que participan, además de contrarrestar el efecto de citosinas inflamatorias y su efecto en la degradación del cartílago articular.

Por otro lado se encuentran las proteínas que participan en el catabolismo del CA, entre ellas, metaloproteinasas (MMPs), a desintegrinas y metaloproteinasas con motivos de trombospondina (ADAMTS), y citosinas catabólicas como las interleucinas (Hashimoto *et al.*, 2008). Las MMP son endopeptidasas con un átomo central de zinc y requieren de Ca²⁺ para llevar a cabo su actividad enzimática; son las principales proteasas involucradas en la degradación de la MEC. Estas proteasas en su mayoría son secretadas al espacio extracelular donde se rompen por actividad proteolítica para su activación, aunque algunas pocas se activan intracelularmente, de tal manera que pueden actuar intracelular o extracelularmente. La expresión de las MMP está regulada por factores inflamatorios, producidos por los condrocitos y las células sinoviales, tales como IL1 y TNF α que

regulan las vías del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) y de la proteína activadora 1 (AP1). Aunque la expresión de esta proteasa es baja en células normales, MMP1 y MMP13 tienen un papel principal en la degradación de colágeno y agregano de la MEC, contribuyendo de esta manera con la remodelación del tejido articular. Las MMP también juegan un papel importante en la angiogénesis, ya que se suelen expresar en casos de cicatrices con ausencia de remodelado vascular para degradar la MEC y favorecer la vascularización de los tejidos (Mehana, Khafaga and El-Blehi, 2019).

Por otra parte, ADAMTS son una familia de proteasas constituida por 19 metaloproteinasas de zinc con dominios propéptido y tipo-desintegrina, que regulan su actividad catalítica; el dominio propéptido favorece un plegamiento del sitio catalítico de la proteína y el dominio similar a desintegrina se encarga de extenderse sobre el dominio de unión de los sustratos favoreciendo la especificidad catabólica. En el cartílago, diversas ADAMTS, particularmente ADAMTS4 y ADAMTS5, rompen el núcleo proteico del agregano lo que compromete las propiedades mecánicas del cartílago y expone al colágeno II a proteólisis (Mead and Apte, 2018).

En cuanto a las citosinas inflamatorias, se considera a la interleucina 1 beta (IL1 β) y al factor de necrosis tumoral (TNF α) como dos de las principales proteínas involucradas en la regulación del metabolismo catabólico en la articulación. Ambas son secretadas por condrocitos, células mononucleares, osteoblastos y tejido sinovial e inducen la producción de diversos factores catabólicos e inflamatorios. IL1 requiere unirse al receptor de IL1 tipo 1 (IL1RI) para activar su función biológica, aunque también puede unirse al receptor IL1RII el cual no tiene la capacidad para transmitir la señal intracelular por lo que actúa como inhibidor de su actividad. Mientras tanto, TNF α puede unirse a dos receptores específicos de la membrana celular, TNFRI y TNFRII, siendo TNFRI quien se encuentra activamente involucrado con la función de TNF en el cartílago. Se ha demostrado que la actividad de ambos disminuye la síntesis de proteínas de la MEC al inhibir la actividad anabólica del condrocito. Tanto IL1 como TNF inhiben la síntesis de colágeno II y proteoglicanos como el agregano. Además, estimulan la liberación de proteasas como MMP1, MMP3, MMP13 y ADAMTS4 (Kapoor *et al.*, 2011).

Retroalimentación entre factores anabólicos y catabólicos en el cartílago

Los procesos anabólicos y catabólicos de la articulación se encuentran intrincadamente relacionados y se regulan entre sí. Por ejemplo, TGF β bloquea la degradación de la MEC al inducir la expresión de la inhibidora de proteasas (TIMP), además de contrarrestar la inducción de metaloproteinasa de matriz 13 (MMP-13) inducida por IL1beta (Philip, 2012). Además, es importante destacar que, aunque las BMP actúan en la vía TGFB/Smad, e IL1 señala a través de la vía de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)-p38- cinasa JUN N terminal (JNK)/NF-kB, ambas vías están relacionadas. Las BMP/TGFB son capaces de activar a las MAPK y las proteínas Smad interactúan directamente con proteínas de la vía como c-Jun y, por el contrario, las cinasas ERK/MAPK son capaces de fosforilar a las Smad previniendo su señalización (Hashimoto *et al.*, 2008). Además, también se ha descrito que bFGF en altas dosis puede estimular la expresión de MMP1, MMP3 y MMP13, en vez de favorecer la producción de proteoglicanos al reducir la presencia de otros factores anabólicos como IGF1 y BMP7 (Hashimoto *et al.*, 2008). Por otro lado, como se mencionó previamente, las citosinas inflamatorias interfieren con la síntesis de proteoglicanos como el agregano y proteínas fibrilares como la colágena II (Kapoor *et al.*, 2011). La relación que existe entre las proteínas que participan en el metabolismo articular refleja la relevancia de estudiar las interacciones genéticas y moleculares para poder explicar la naturaleza de enfermedades complejas como la OA.

Daño articular y OA

La OA se asocia a un desbalance de los procesos metabólicos descritos resultando en un aumento de la actividad catabólica sobre la anabólica causando alteraciones en la composición molecular y organización de la MEC, lo que lleva al deterioro de la integridad de la superficie articular y el cartílago subyacente. Esto ocasiona cambios tisulares que van desde condromalacia o reblandecimiento del cartílago y HS, pérdida de la continuidad, erosiones, hasta la deformación de la morfología del complejo articular con la formación de osteofitos y pérdida del espacio articular. Se ha sugerido que procesos metabólicos (v. gr., obesidad), traumatismos y la edad, son capaces de provocar un

aumento en la expresión de factores pro-inflamatorios locales y sistémicos. Estos factores inflamatorios son producidos y secretados por los condrocitos, pero también por otras estructuras de la articulación como las células sinoviales provocando, en última instancia, una sobreexpresión de las proteasas degradadoras de MEC que causarán un desbalance en el modelado y remodelado de CA y HS, dando como resultado el deterioro funcional de la articulación y la sintomatología de OA (Mehana, Khafaga and El-Blehi, 2019; Berenbaum and Walker, 2020).

En las etapas iniciales de la OA, los condrocitos aumentan su proliferación y agrupamiento, así como la producción de proteínas de la MEC, mientras que en las etapas más avanzadas comienzan a incrementar la actividad catalítica producto de la elevación en la expresión de proteínas catabólicas. Los cambios celulares se asocian con un aumento en la expresión de proteínas reguladoras, proteínas de la MEC, relacionadas con el estrés, marcadores de apoptosis y factores de transcripción, lo que acompaña a la fibrilación del cartílago de superficie y la formación de fibrocartílago en zonas localizadas (Goldring and Goldring, 2010). Los cambios que presenta el cartílago en la progresión de la OA se han clasificado en una escala de daño patológico articular que trata de correlacionar los cambios morfológicos del cartílago con OA y los cambios funcionales de la articulación. Esta escala describe los siguientes grados de afectación: grado 0 o morfología intacta, grado 1 o de superficie intacta (edema y abrasión superficial con condensación local de MEC, proliferación, hipertrofia y agrupamiento celular), grado 2 o discontinuidad superficial (discontinuidad de la MEC superficial, depleción del tercio superior de cartílago, apoptosis proliferación e hipertrofia celular), grado 3 o fisuras verticales (fisuras verticales en la zona media de la MEC, nuevas formaciones de colágeno, apoptosis, regeneración, hipertrofia y formación de dominios adyacentes a las fisuras), grado 4 o erosión (pérdida de la MEC, delaminación de la capa superficial, formación de quistes, excavación), grado 5 o denudación (esclerosis ósea o formación de fibrocartílago en superficies desnudas, microfracturas con reparación limitada a la superficie ósea) y grado 6 o deformación (remodelación ósea o formación de osteofitos más deformación, micro-fracturas con reparación a base de fibrocartílago y hueso extendidos en donde estaba la superficie cartilaginosa) (Pritzker *et al.*, 2006).

El HS también se somete a procesos de modelación y remodelación para poder mantener la forma adecuada del complejo articular. Estos procesos son desarrollados por las células propias del hueso como osteoblastos, quienes producen la MEC ósea, y osteoclastos, que la degradan favoreciendo la resorción de Ca^{++} para mantener los niveles sanguíneos de este mineral. Los osteocitos regulan la remodelación ósea en respuesta a un estímulo mecánico a través de su señalización con osteoblastos y osteoclastos y la liberación de mediadores moleculares. En respuesta al incremento en la carga mecánica los osteocitos disminuyen la secreción de esclerostina, que actúa como inhibidor de la vía de la proteína tipo-sin alas (WNT). Esto resulta en un incremento en la señalización de WNT y estimula la formación de hueso mediada por osteoblastos. Por el contrario, la disminución de la carga resulta en un incremento en la secreción del ligando del receptor activador de NFkB (RANKL), el cual estimula la diferenciación de los osteoclastos e incrementa la resorción ósea (Martel-Pelletier *et al.*, 2016). En OA, el HS sufre cambios que incluyen un aumento en el recambio óseo, microfracturas, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la esclerosis ósea. También se observa un adelgazamiento del cartílago suprayacente, que los nuevos vasos sanguíneos penetran en el cartílago calcificado desde el HS y un subsecuente engrosamiento del HS; esto provoca rigidez del tejido óseo, pérdida de su propiedad para absorber el impacto, un aumento en la carga mecánica y posteriormente la ruptura del cartílago articular (Goldring and Goldring, 2010; Castañeda *et al.*, 2012).

Factores de riesgo

La OA es una enfermedad de etiología multifactorial en la que se encuentran involucrados diversos factores de riesgo que actúan a nivel local y sistémico. Los factores locales son aquellos que alteran la estabilidad biomecánica y la morfología osteo-articular, entre estos se encuentran la pérdida de fuerza muscular, el aumento de carga articular anormal por defectos de alineamiento, las actividades ocupacionales como bombero o trabajo en la construcción, el deporte de alto impacto o alto rendimiento, la cirugía articular, los traumatismos directos como fracturas o ruptura de ligamentos y las lesiones pre-radiográficas como sinovitis o anomalías en meniscos, cartílago y médula ósea

(Martel-Pelletier *et al.*, 2016; Vina and Kwoh, 2018). Se podría decir que los factores locales son factores desencadenantes y se asocian etiológicamente a la OA secundaria.

Los factores sistémicos actúan a nivel de la susceptibilidad del individuo (Martel-Pelletier *et al.*, 2016). Pueden dividirse en sociodemográficos como la edad avanzada, el sexo femenino, la etnia, los factores metabólicos como obesidad o síndrome metabólico, los factores dietéticos como el consumo de fibra, el aumento en la densidad mineral ósea, además de los factores genéticos (Vina and Kwoh, 2018).

Factores genéticos

Se ha demostrado que los factores hereditarios juegan un papel importante en la susceptibilidad para el desarrollo de OA. En los años 40 del siglo XX, Robert Stecher publicó un reporte sobre sus estudios acerca de la herencia de los nódulos de Heberden, descritos como el ensanchamiento de la articulación interfalángica distal de los dedos de las manos secundario a artritis hipertrófica. En estos estudios basados en las genealogías de 74 personas afectadas, los autores sugerían que estos nódulos presentaban una forma de herencia dominante en mujeres y recesiva en hombres (Stecher and Hersh, 1944). Kellgren, Lawrence y Bier, argumentando que los estudios de Stecher solo se enfocaban a la artritis inter-falángica distal y no a otros sitios probablemente afectados, también reportaron sus estudios de los factores genéticos de OA generalizada que definieron como el diagnóstico radiográfico de artrosis en 5 o más articulaciones de 30 sitios estudiados en 52 participantes y sus hermanos. Como parte de sus resultados reportaron un incremento en el riesgo de desarrollar OA generalizada que aumentaba de acuerdo al número de sitios afectados en el probando. También sugieren que son distintos factores genéticos los que se relacionan con la OA generalizada y los nódulos de Heberden aislados con lo que sugieren una influencia poligénica en el desarrollo de OA (Kellgren, Lawrence and Bier, 1963). En los años 90s, Spector reportó un estudio en 500 parejas de gemelos monocigotos y dicigotos de sexo femenino, de entre 48 y 69 años, que fueron evaluadas radiográficamente para OA de mano y rodilla. En este estudio se observó una concordancia mayor casi el doble en las parejas de monocigotos comparadas con las parejas de dicigotos y se estimó que la influencia de los factores genéticos para el desarrollo de OA es entre el

40-65% dependiendo del sitio afectado (Spector *et al.*, 1996). Estos estudios demuestran una clara influencia de múltiples factores genéticos en el desarrollo de distintas formas de OA.

Con el desarrollo de la biotecnología y las técnicas de biología molecular se ha logrado profundizar en el reconocimiento de los genes que participan en la predisposición hereditaria de las enfermedades. Esto permitió el desarrollo de nuevas metodologías para abordar el estudio de las secuencias de DNA de las proteínas que se relacionan con el metabolismo articular y su participación en la fisiopatología de la OA. Múltiples estudios de asociación con genes candidato y, más recientemente, estudios amplios del genoma (GWAS) han identificado diferentes variantes alélicas de múltiples genes que participan en las diversas funciones articulares, algunos relacionados con la composición y el mantenimiento de la matriz extracelular, actividad metabólica de los condrocitos, implicados con la regulación de la densidad y la masa ósea, entre otras funciones (Claessen *et al.*, 2012; Raine *et al.*, 2012; Song, Kim and Lee, 2014; R. Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, no todas las variantes asociadas parecen tener una prevalencia constante en los distintos estudios o poblaciones estudiadas. Por otro lado, Las variantes genéticas que se han mantenido asociadas a través de las investigaciones en las que se ha estudiado han mantenido una fuerza de asociación más bien pequeña (Yucesoy *et al.*, 2015; Aubourg *et al.*, 2021).

Los genes *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* en el desarrollo de OA

En nuestro estudio analizamos la asociación genética y epistática entre algunas variantes de un solo nucleótido (SNV) en los genes *LEP* (leptina), *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* (receptor de activina tipo 1) con el desarrollo de OA de rodilla, porque sabemos que estos genes se encuentran involucrados de forma importante en los distintos procesos metabólicos que llevan a cabo los tejidos para mantener la homeostasis articular y su función, tanto como los mecanismos patológicos que llevan al daño articular y OA. (Nishida, Knudson and Knudson, 2004a; Brown *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2014; P. Zhang *et al.*, 2015). Además, estudiamos a sus variantes con base en la evidencia que exponemos a continuación y por los motivos que se expondrán en el apartado de metodología, más adelante.

Gen LEP

El gen *LEP* se localiza en 7q31.3 y codifica para una proteína de 16k perteneciente a la súper-familia de citosinas tipo 1, llamada leptina (Isse *et al.*, 1995; Frühbeck, 2006). Esta proteína se encontró expresada por primera vez en tejido adiposo; sin embargo, se sabe que se expresa de forma pleiotrópica (Frühbeck, 2006). Clásicamente, se considera una adipocina por su función en la regulación del metabolismo energético, ya que puede disminuir el apetito y aumenta la tasa metabólica basal. Sin embargo, también tiene participación en las vías metabólicas de angiogénesis, inflamación, inmunidad, remodelación ósea, entre otras (Motyl and Rosen, 2012; Park and Ahima, 2014; Scotece *et al.*, 2014; Khazaei and Tahergerabi, 2015).

Para llevar a cabo sus funciones, la leptina actúa sobre receptores específicos en la membrana celular (LEPR). La leptina se une al sitio de unión en LEPR y causa su dimerización con lo que activa a la cinasa JAK2 que desencadena una cascada de fosforilación en la que se activan diversas vías. Entre las moléculas fosforiladas por JAK2 se encuentra STAT3, el cual se dimeriza y se expone como señal en el núcleo para después entrar y regular la expresión de genes a través de la activación de proteínas como el receptor de estrógenos 1 (ESR1) que se encarga de estimular la expresión de inhibidoras de proteasas de la MEC como TIMP1. Por otro lado, JAK2 también activa segundos mensajeros de las vías NFkB1 y MAPK, que desembocan en la expresión de factores pro-apoptosis como BCL2L1 (Gorska *et al.*, 2010; Denver, Bonett and Boorse, 2011).

En cuanto a su relación con OA, se ha reportado que el aumento en los niveles de leptina en plasma y líquido sinovial se encuentran asociados con osteoartritis. En modelos murinos con delección del gen *ob/ob* se observó resistencia al desarrollo del fenotipo OA. Su asociación se explicó inicialmente por su relación con la obesidad y el sobrepeso, aunque su papel en la señalización de las vías inflamatorias también fue importante, ya que favorece la activación de diversos factores catabólicos que desencadenan la destrucción del CA (Park and Ahima, 2014). En el condrocito, la leptina puede aumentar la expresión de IL1, IL8, MMP9, MMP13, y MMP2, además de otros factores catabólicos como la catepsina D. En el sinoviocito favorece el incremento en la expresión IL6 y MMP13 y también actúan en los osteocitos favoreciendo el incremento del metabolismo óseo. Estas actividades

incrementan el catabolismo en el CA, inhiben la síntesis de moléculas de la MEC cartilaginosa y favorecen el desarrollo de OA (Yan *et al.*, 2018). Algo muy interesante es que también se ha observado que la leptina puede aumentar la expresión de factores anabólicos como TGF β e IGF1 y, más aun, aumentar la producción de colágeno II y proteoglicanos como agregano o estimular la proliferación de los condrocitos (Yan *et al.*, 2018). La leptina tiene un papel muy relevante en el desarrollo de OA ya que interactúa con moléculas de distintas vías relacionadas con la degradación de la MEC y el daño articular.

Las variantes de un solo nucleótido de *LEP* también han sido asociadas a OA de rodilla. En pacientes chinos de Nanjing se encontró que las variantes de *LEP*, rs11761556, rs12706832, rs2071045 y sus haplotipos, se encontraron asociadas con el diagnóstico radiológico de OA de rodilla, con un perfil distinto dependiente del índice de masa corporal (IMC) (Qin *et al.*, 2010). Este estudio sugiere que en la asociación de las variantes de *LEP* con OA dependen del contexto genético y medioambiental en el que son estudiadas.

En este estudio analizamos la variante rs2167270, la cual es un cambio de guanina por adenina, localizado en la región 5' no traducida (UTR 5') del gen *LEP*. Esta variante se asocia de forma significativa con los niveles circulantes de leptina, lo que explica la variación de hasta el 10% de los niveles circulantes de la hormona en pacientes obesas (Dasgupta *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2020). Por otra parte, se ha observado que el genotipo AA se asocia con un incremento en la metilación del gen *LEP* tanto en placenta como en cordón umbilical (Lesseur *et al.*, 2013; Daniels *et al.*, 2020). Es interesante que esta variante tiene un efecto funcional en la expresión de *LEP*, mismo que podría estar modificado por la interacción con otras variantes genéticas.

Aunque existe evidencia de la ausencia de asociación significativa de rs2167270 con OA de mano (Hämäläinen *et al.*, 2018), no se encontró ningún reporte de la literatura de la asociación entre rs2167270 con OA de rodilla. Esto es relevante porque la evidencia sugiere que los perfiles de asociación genética son diferentes en relación al sitio anatómico de OA, aunque las vías moleculares de daño articular pueden coincidir (Wang *et al.*, 2016; Marshall *et al.*, 2018).

Gen VEGF

El gen del factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) se localiza en 6p21.1 y codifica al factor de crecimiento más importante en la regulación de la angiogénesis (Ruggiero *et al.*, 2011). *VEGF* es una proteína que es secretada y su función depende del aumento de su expresión y la de sus receptores de tipo tirosina-cinasa, *VEGFR1* y *VEGFR2*. Esta unión también está mediada por cofactores como neuropilina 1 y 2 que potencian la señalización de *VEGFR*. *VEGF* actúa en una amplia variedad de tipos celulares y desempeña distintas funciones como, angiogénesis, mitogénesis, supervivencia celular, permeabilidad vascular, vasodilatación, entre otras (Leung *et al.*, 1989); también se expresa en distintos tejidos como pulmón, riñón, cerebro, además de los tejidos articulares como CA, HS y tejido sinovial (Eichmann and Simons, 2012).

La angiogénesis es un proceso muy importante en el crecimiento, diferenciación, distribución y reparación de los tejidos (Murata, Yudoh and Masuko, 2008; Lee *et al.*, 2012). Además es un proceso importante en relación con la osificación endocondral (OE), fenómeno mediante el cual se forma hueso a partir de un molde cartilaginoso que se osifica por influencia de la infiltración de vasos sanguíneos en la placa (Prein and Beier, 2019). En este proceso están involucradas la hipertrofia de los condrocitos, apoptosis, invasión vascular, engrosamiento del cartílago calcificado y adelgazamiento del cartílago superficial. Estas características también forman parte en el desarrollo de la OA (Xiao and Lin, 2016). Partiendo de estas hipótesis, Yun Chen *et al.*, realizaron una serie de experimentos en un modelo de rata al cual se le sometió a privación del sueño con la intención de que desarrollara OA en la articulación temporo-mandibular (ATM). Observaron que el cartílago de las ratas que sufrieron privación del sueño desarrolló OA de forma progresiva relacionada con las semanas que duró el experimento. También se observó un aumento en la densidad microvascular desde el HS hacia el CA que se correlacionaba de forma positiva con la gravedad de la OA y además con la expresión de *HIF1*, *VEGF* y *Notch1* (Chen *et al.*, 2019). Esto demuestra que la vía de *HIF1/VEGF/NOTCH1* y el desarrollo de angiogénesis son procesos primordiales para el desarrollo de OA.

En OA también hay evidencia de la importancia de VEGF y su participación en las vías de daño articular. En pacientes con OA, se ha observado que la expresión de VEGF está incrementada tanto en el CA, HS, tejido sinovial, líquido sinovial y suero. En líquido sinovial, VEGF ha mostrado su función como biomarcador tras correlacionarse con el grado de afectación de OA e incluso con la gravedad del dolor articular (Murata, Yudoh and Masuko, 2008; Duan *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2016).

La expresión de *VEGF* y sus receptores es estimulada en los tejidos articulares por factores mecánicos, hipoxia, factores de crecimiento, citosinas inflamatorias, envejecimiento, hipertrofia de los condrocitos, etcétera. Esto favorece el desarrollo de procesos como sinovitis con el aumento de producción de interleucinas y TNF α , la degeneración del cartílago debido al incremento de MMPs, supresión de las proteínas inhibidoras y síntesis de MEC, formación de esclerosis por el aumento en el recambio óseo tras estimulación de la actividad de osteoblastos y osteoclastos, por el incremento en la expresión de RANKL; provocando invasión neurovascular del tejido sinovial, HS y CA, lo que conlleva al desarrollo de osteofitos y sensibilización al dolor (Hamilton *et al.*, 2016).

Por otra parte, en diversos estudios de asociación genética, incluyendo GWAS, han concluido que las variantes de *VEGF* se asocian de forma importante al desarrollo de OA (Rodríguez-fontenla, Calaza, Evangelou, Ana M Valdes, *et al.*, 2014). Como podemos darnos cuenta, las vías de participación de *VEGF* en el desarrollo de las enfermedades son muy diversas y no están dilucidadas por completo. Además, las variantes en su estructura juegan un papel relevante en la regulación de su función y de las interacciones moleculares en la que participan, por lo que su investigación es de gran relevancia en el estudio del desarrollo de OA.

Tomando esto en consideración decidimos estudiar el papel que juegan las SNV rs2010963 y rs25648 de *VEGF* en el desarrollo de OA en nuestra población. La variante rs2010963 se localiza en 5' UTR y es un cambio de citosina por una guanina, mientras que rs25648 es una transición (C>T), localizada en una región traducida, que resulta en un cambio sinónimo (Ser>Ser). De estas variantes, solo rs2010963 ha sido estudiado en relación con OA de rodilla en pacientes mexicanos (Sánchez-Enríquez *et al.*, 2008). En este estudio no se encontró asociación significativa entre las variantes de

LEP con OA de rodilla, aunque es notorio que existe una diferencia significativa en el IMC entre los casos y controles de la muestra estudiada que podría influir en los resultados observados, por lo que consideramos relevante analizar nuevamente esta asociación.

Gen COL11A1

El gen de la colágena tipo XI *COL11A1* se localiza en 1p21.1, tiene 68 exones y codifica un mRNA de 150kb que se traduce en la fibrilla de colágena COL11A1. Esta fibrilla forma parte de un heterotrímero que junto con COL11A1 y COL2A1 forman la molécula de colágena tipo XI que se encuentra usualmente asociada con colágena tipo II, además de regular también la fibrillogénesis de colágena tipo I, por lo que se expresa de forma importante en el tejido articular y otros órganos como el ojo, lengua, o intestino (Zhidkova, Justice and Mayne, 1995; Annunen *et al.*, 1999). Por tanto, tiene una participación importante en la formación de cartílago y el desarrollo esquelético (Brown *et al.*, 2011). En la formación de cartílago, COL11A1 es el primer tipo de colágena que se deposita en la células mesenquimatosas que inician su diferenciación hacia condroblastos (Xu *et al.*, 2008). También participa en la mineralización ósea al jugar un rol en el formación y ensamblado de las fibras de colágeno durante la osificación endocondral (Hafez *et al.*, 2015a). La colágena tipo XI, como componente de la MEC, juega un papel muy importante en la homeostasis de las distintas estructuras que conforman la articulación, ya que ejerce una función de sostén al unirse con otras proteínas y componentes de la MEC.

El gen *COL11A1* se puede expresar a partir del estímulo de factores de transcripción como la proteína potenciadora de CCAAT beta (c/EBPB), factor de transcripción nuclear (NF-Y), proteína específica 1 (Sp1) y oncogén viral de mieloblastosis B (B-myb), además de factores de crecimiento como TGFB1, proteína asociada a microfibrillas 5 (MFAP5), y factor de unión a potenciador linfocitario 1 (Lef1), dependiendo del tejido analizado, como se ha observado en muestras de distintas neoplasias (Nallanthighal, Heiserman and Cheon, 2021). Su mRNA se traduce primero en una protocolágena la cual, una vez procesada para su función, forma heterotrímeros con otras cadenas alfa de colágena en el CA, como COL11A2 y COL2A1, aunque también se ha observado que puede formar heterotrímeros con COL5A1 y COL5A2 en otros tejidos (Tegeder and Lötsch, 2009); De esta

manera conforman columnas de fibras que sirven de sostén para las demás moléculas de la MEC de los tejidos en lo que participa. Por otro lado, a través de su dominio N terminal, también puede unirse a otras moléculas de la MEC como, proteoglicanos, componentes proteicos, otras colágenas. Además se puede unir a proteínas de las células cercanas como anexinas o proteínas de shock por calor (HSP), o incluso factores inflamatorios como OSM que inducen la señalización por la vía de STAT (Nallanthighal, Heiserman and Cheon, 2021). COL11A1 también es susceptible a degradación por MMP2. Además, en ratones DBA/1 se desarrolla una artritis leve y, en ratas Lewis, la inmunización contra colágena tipo XI induce una artritis crónica, depósitos de IgG en el cartílago y destrucción articular (Luo *et al.*, 2017). El papel de COL11A1 en OA va más allá de ser una proteína degradada por los factores catabólicos articulares, por lo que su papel en la comunicación con otras células y moléculas que participan en la función articular debe ser dilucidado.

Por otro lado, el gen *COL11A1* y sus variantes juegan un papel importante en la enfermedad articular. En modelos animales heterocigotos para una mutación en *Col11a1* (-/*cho*) se observó que la mutación favorecía la degradación de colágena tipo II en el cartílago articular (Rodríguez *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que las mutaciones en este gen son la etiología de padecimientos que involucran al sistema conectivo, predominantemente, oftálmico, oro-facial, auditiva y articular, tales como el síndrome de Stickler tipo 2 y el síndrome de Marshall (Snead and Yates, 1999; Sakka *et al.*, 2015).

Las variantes de *COL11A1* que abordaremos en este estudio, rs1676486 y rs3753841, se encuentran en una región traducida y son funcionales, son cambios de nucleótido *A>G* y *C>T* (cadena reversa), y se traducen como Ser>Pro y Pro>Leu, respectivamente. En distintos estudios se ha reportado que rs1676486 tiene un efecto negativo sobre la expresión e inestabilidad del transcrito de mRNA de *COL11A1* (Mio *et al.*, 2007; Raine *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017) y, además, se comporta de forma distinta en su efecto sobre el fenotipo dependiendo de la combinación de alelos con otras fibra de colágeno (Mio *et al.*, 2007; Hay *et al.*, 2013; Dada *et al.*, 2016). También se ha estudiado la asociación de estas variantes con OA. Por un lado, rs1676486 no se encontró asociado de forma individual a OA en un estudio de casos y controles realizado en una muestra de pacientes de

Newcastle y North Tyneside (Raine *et al.*, 2013). Sin embargo, en un GWAS realizado en poblaciones caucásicas que analizó la asociación de la forma ósea con las señales de distintos *loci*, se encontró asociación significativa entre rs3753841 y la estatura en los pacientes con OA (Styrkarsdottir, 2019). En un meta-análisis previo en el que se analizaron pacientes de poblaciones ingleses e islandeses, ese mismo grupo de investigación había encontrado asociación de rs3753841 con OA de cadera, pero no con OA de rodilla (Styrkarsdottir *et al.*, 2018). Estos estudios nos sugieren que estas variantes podrían jugar un papel relevante en OA. Los estudios de asociación de estas variantes con OA se han realizado principalmente en poblaciones caucásicas, y en nuestra revisión no encontramos estudios publicados en la población mexicana, por eso consideramos que se requieren más estudios para profundizar en el papel que estas variantes podrían jugar en nuestra población.

Gen ACVR1

El gen *ACVR1* se localiza en 1q24.1 y codifica para un receptor transmembrana de tipo cinasa de serina-treonina llamado Receptor de Activina tipo 1 (también conocido como cinasa tipo receptor de activina 2, ALK2). *ACVR1* participa en las vías de señalización de BMP/TGF β . Para su activación requiere la unión de BMP7, lo que desencadena una cascada de fosforilación y activación de los mensajeros de la vía de Smad 1/5/8 (Frederick S Kaplan, Pignolo and Shore, 2013). Por lo que juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y migración celular, de las células del hueso y el cartílago. Por ejemplo, la acción de BMP7 (también conocido como Proteína osteogénica-1, OP-1, por sus siglas en inglés) sobre el cartílago previene la hipertrofia del condrocito y favorece su proliferación (C Baugé *et al.*, 2014). También se ha observado que OP-1 inhibe la degradación de MEC en modelos celulares de condrocitos humanos con OA inducida por hexasacárido de hialuronano (Nishida, Knudson and Knudson, 2004a). Así mismo, participa en la reparación del cartílago mediante la estimulación de la síntesis de los componentes de la MEC y regula la expresión de otros factores anabólicos como TGF β e IGF1 (Chubinskaya, Hurtig and Rueger, 2007a). Inclusive, se ha observado que favorece la reparación de tejido fibroso induciendo la expresión de MMP2 y el declive de colágena tipo I a través de la vía de Smad 2, 3/inhibidor de la actividad del plasminógeno 1 (PAI1) en fibrocartílago de sujetos con OA de etapas tardías (Ripmeester *et al.*, 2021). El Factor

tipo Kluffer 10 (KFL10), conocido por inhibir la osteoclastogénesis y resorción ósea, es activado por la acción de TGFB1 y enlaza la vía de TGFB con la expresión génica estimulando la expresión de AVCR1 e inhibiendo la proliferación y migración de condrocitos en cartílago con OA (Zheng *et al.*, 2020). El papel de AVCR1 como parte de la vía TGFB es importante para la homeostasis del cartílago y el hueso.

ACVR1 tiene una participación importante en la osificación endocondral. La fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) es una enfermedad rara, causada por mutaciones en el gen *ACVR1*. Se caracteriza por *hallux valgus* congénito y brotes episódicos de hueso heterotópico (exoesqueleto) que la mayoría de las veces se relacionan con procesos inflamatorios previos, provocando la formación progresiva de un exoesqueleto que disminuye la movilidad (Kaplan, Pignolo and Shore, 2009). En las células progenitoras mesenquimales de un modelo murino heterocigoto para la mutación con ganancia de función *R206H* en *Alk2* (*Alk2^{R206H/+}*), la mutación más frecuente en los pacientes con FOP, se observó que las células con la mutación presentaban una diferenciación condrogénica acelerada. Además, *in vivo* iniciaron un proceso robusto de osificación endocondral heterotópica y reclutaban células con genotipo silvestre para su contribución, todo esto a través de una señalización de la vía aumentada aun en ausencia de ligando, provocado por la ganancia de función de *Alk2* (Culbert *et al.*, 2014). En los pacientes con la mutación *ACVR1^{R206H/+}* también se ha observado un aumento en la señalización de BMP, lo que provoca la osificación de la placa cartilaginosa y una disrupción del desarrollo y mantenimiento articular (Towler, Shore and Kaplan, 2020). De forma interesante, la activina A que normalmente antagoniza la vía de BMP/Smad se encontró estimulando la fosforilación de Smad1 y Smad5, promoviendo la condrogénesis a través de su ligamiento con ACVR1 con la mutación R206H (Hatsell *et al.*, 2015). Por otro lado, la expresión de ACVR1 está aumentada en condrocitos y células mesenquimales humanas con OA, compensando la ausencia de otros receptores de la vía como ALK5 y TGFBR1, lo que provoca una modificación de la señalización. También se observó que la inhibición de la expresión de *ALK2* disminuía la expresión de MMP13. Por otra parte en un modelo de ratón, el tratamiento con LDN193189, un inhibidor de *ALK2*, disminuyó de forma considerable la severidad de OA después de una lesión además redujo la expresión de pSMAD1, MMP13, COLX, y

aumento la expresión de COLII, lo que mostró su capacidad para potenciar las actividades anabólicas e inhibir la degradación de cartílago (Liu *et al.*, 2020). La participación de ACVR1 en la osificación endocondral resulta muy relevante en relación al papel que juega en la patogénesis de OA.

Por otro lado, el estudio de las variantes genéticas de *ACVR1* involucra a órganos diversos, por ejemplo, se ha estudiado su asociación con aborto espontáneo (Hanna *et al.*, 2010) y cáncer (Nan, Dorgan and Rebbeck, 2014). En este estudio nosotros evaluaremos la asociación de dos variantes, rs1146031 y rs2227861. La SNV rs1146031 codifica un cambio de guanina por adenina en el exón 8 del gen *ACVR1*, lo que se traduce en un cambio sinónimo en el lugar de una glutamina. Mientras que rs2227861 se localiza en el exón 5 y codifica un cambio de citosina por timina en un codón de alanina, cambio también sinónimo. Son pocos los estudios en los que se ha estudiado la asociación de rs1146031 y rs2227861 con las enfermedades complejas y ninguno ha estudiado su papel en OA u otra enfermedad articular. Considerando la importancia de la participación que tiene la vía de TGF β en el metabolismo articular, es posible hipotetizar que estas SNV pueden estar jugando un papel relevante en su desarrollo.

Epistasis

La epistasis se define como el efecto que tiene una variante genética sobre el efecto de otra variante de otros genes o del mismo gen. A principios del siglo XX, William Bateson, uso la palabra epistasis para referirse al efecto de una variante de un locus para prevenir la expresión del efecto de otro locus, en sus estudios sobre la predicción de fenotipos a partir de la segregación génica. Es decir, el efecto de la mutación A en un locus se ve enmascarado en presencia de B en otro locus. Fue entendido como una extensión de la dominancia entre las variantes genéticas (Cordell, 2002; Phillips, 2008). Para entender la propuesta de Bateson podemos plantearnos un ejemplo, digamos que tenemos 2 locus con sus variantes cuya expresión se relaciona con el color de pelo en ratas, donde el locus N tiene dos alelos *N* y *n*, mientras que el locus C tiene los alelos *C* y *c*. Ahora, supongamos que realizamos una tabla con los fenotipos encontrados dependiendo del genotipo de los sujetos de estudio, y nos damos cuenta de la siguiente relación: en presencia del alelo *N* (*NN* o *Nn*),

independientemente del genotipo en el locus C, el color del pelo fue negro; cuando el genotipo *nn* estaba presente y en presencia del alelo C (*CC* y *Cc*), el color de pelo era café; sin embargo, en presencia de *nn* y *cc* el pelo resultó blanco. Es decir, en presencia de N el genotipo en el locus C no se expresa en el fenotipo; la variante N enmascara a C (Cordell, 2002; Phillips, 2008). Por su parte, Ronald Fisher estudió el fenómeno desde una perspectiva estadística, en la cual se refirió a la epistasis como una desviación de la aditividad en el efecto de dos alelos de diferentes *loci* respecto a su contribución en un rasgo fenotípico cuantitativo. Esta definición va de acuerdo a un modelo lineal de interacción estadística. Esto hace que sea la escala de medición de las variables de lo que puede depender el hecho de identificar la interacción entre ellas. En este sentido, encontrar un efecto epistático depende de la escala con que se midan las variables y el modelo matemático definido para interpretarla (Cordell, 2002; Phillips, 2008).

A partir de las interpretaciones de Bateson y Fisher se construyen los conceptos de epistasis biológica y estadística, respectivamente. Según estos conceptos la epistasis biológica ocurre cuando las variantes genéticas tienen un efecto en la interacción física entre las biomoléculas que codifican y con las que se relacionan; mientras que podemos considerar epistasis estadística cuando solo se considera la fuerza de asociación entre las interacciones genéticas con los desenlaces clínicos estudiados en una población estudiada (Moore, 2010). Un aspecto importante a considerar respecto a estas definiciones, es que la epistasis biológica no siempre pueden correlacionarse o corroborarse a partir de resultados estadísticos y viceversa, debido a que la interacción encontrada estadísticamente podría deberse a distintos mecanismos biológicos, por eso es importante tener una base biológica fundamentada para que los resultados referidos como epistasis estadística nos puedan orientar respecto a los mecanismos biológicos subyacentes de las enfermedades (Cordell, 2002).

Esto ha llevado a proponer otras definiciones de epistasis relacionadas con los conceptos definidos previamente. Dentro de estas se han definido dos principales tipos de epistasis: *epistasis no específica*, en la cual la interacción depende solo del tamaño del efecto de las mutaciones involucradas; o, *epistasis específica*, cuando se toma en cuenta la identidad de las mutaciones

(Domingo, Baeza-Centurion and Lehner, 2019). La epistasis no específica emerge de la relación no lineal entre el fenotipo medido y los rasgos biofísicos que subyacen, en los cuales las mutaciones tienen un efecto. La epistasis no específica surge de mecanismos que incluyen la termodinámica del plegamiento proteico, cooperatividad, competencia molecular mutuamente exclusiva, y funciones en la expresión ajustada no lineal. Por otro lado, la epistasis específica ocurre cuando las mutaciones no actúan de forma aditiva en el nivel de los rasgos biofísicos subyacentes. Los mecanismos de los que surge la epistasis específica incluyen mutaciones que están en regiones muy próximas dentro de la estructura tridimensional de una macromolécula, creando nuevas especificidades para ligando o compañeros, y cambiando la afinidad por los sitios de unión a DNA o RNA, entre otras cosas.

Teniendo en cuenta que la epistasis está prevalente no solo entre los genes sino también dentro de ellos, es importante considerar que las interacciones pueden llevarse a cabo entre pares de genes o, involucrar un mayor número de variantes genéticas, lo que se denomina epistasis de alto orden (Domingo, Baeza-Centurion and Lehner, 2019). De esta manera, podemos atender que la interacción entre pares puede cambiar en presencia de mutaciones adicionales en el contexto genético (alto orden) o debido a cambios en el medio ambiente, lo que tiene implicaciones en la susceptibilidad y desarrollo de las enfermedades.

De forma interesante, una de las problemáticas importantes relacionadas con los análisis en los estudios de epistasis es que la cantidad de posibles interacciones incrementa en cantidad y complejidad en relación con el número de variantes que se incluyan en el estudio, por ejemplo, en el caso de GWAS (Moore, 2010; Chattopadhyay and Lu, 2019). Esto ha llevado a los investigadores a realizar un análisis a múltiples niveles, por ejemplo, seleccionar cuidadosamente las variantes respecto a la frecuencia del alelo menor (MAF). Sin embargo, esto puede dejar fuera del análisis a las variantes raras o de poca frecuencia, mismas que podrían tener un efecto sobre la heredabilidad del fenotipo. Así mismo, es interesante que, aunque existe un esfuerzo mundial por crear grandes bases de datos con millones de variantes de un solo nucleótido (SNV), los estudios de epistasis se vuelvan extremadamente difíciles de analizar, precisamente por la alta dimensionalidad.

Actualmente, una herramienta ampliamente usada y diseñada para reducir la dimensionalidad entre un alto orden de variables, es la reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR), el cuál es un método no paramétrico, de modelo libre (no asume ningún modelo genético), que tiene como fundamento la inducción constructiva de variables binarias (alto y bajo riesgo) a partir de la combinación de múltiples atributos, en este caso, múltiples genotipos (dimensionalidad múltiple) usando la razón de casos y controles (Moore, 2010; Chattopadhyay and Lu, 2019). MDR analiza la distribución de la frecuencia de casos y controles en cada una de las combinaciones posibles entre los genotipos de las variantes estudiadas; si la frecuencia de casos es mayor, se clasifica como alto riesgo y, en caso contrario, bajo riesgo. Partiendo de estos datos se forma una nueva variable con las categorías de alto y bajo riesgo haciendo uso de la regla “si, entonces” basados en la distribución de combinaciones genotípicas; por ejemplo, si en la casilla *NN/BB* la frecuencia de casos es mayor que la de controles, usando la regla “si, entonces”, si los sujetos *NN* en locus 1 y *BB* en locus 2 entonces *NN/BB*= alto riesgo. De esta manera se induce una reducción de las múltiples dimensiones representadas por las combinaciones intergenotípicas construyendo una sola variable dicotómica que condensa toda esa información. Posteriormente, MDR analiza la asociación de esta variable con el fenotipo de interés y prueba la consistencia de la información a través de la validación cruzada dividiendo la muestra total en submuestras. Con esto se evalúa la precisión de cada modelo de interacción analizado para predecir el fenotipo estudiado.

Para su interpretación, este método propone un mejor modelo de interacción basado en la precisión para predecir el fenotipo y la consistencia de validación cruzada. También proporciona herramientas gráficas como dendogramas basados en una escala de colores para determinar si la interacción analizada se trata de epistasis o un efecto independiente (desde el rojo que indica epistasis, al azul que significa redundancia), además de la ganancia de información (GI) que aportan los modelos de interacción al fenotipo estudiado y los efectos independientes de cada variable, permitiéndonos determinar si los efectos corresponden a un efecto sinérgico (GI positiva) o a efectos independientes o redundantes (GI igual o menor a 0, respectivamente). Los criterios de interpretación de MDR se comentan a mayor profundidad en la sección de metodología. Otras ventajas del método MDR para

el análisis de epistasis en las enfermedades multifactoriales son, que puede evaluar interacción gen-gen entre variables genéticas que no necesariamente están asociadas de forma individual con algún rasgo, además, es muy útil cuando se estudian muestras de tamaño pequeño o cuando se estudian pocas SNV (Ritchie *et al.*, 2001a; Motsinger and Ritchie, 2006; Gui *et al.*, 2010; Moore, 2010).

En general, podemos decir que la selección de las variantes, sus características, el contexto genómico y las herramientas de análisis estadístico son parámetros de gran importancia para la validez de los estudios de epistasis.

Estudios de epistasis en OA

En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se ha investigado el fenómeno de epistasis e interacción genética con el desarrollo de OA. Se ha reportado evidencia de epistasis *in silico* y en tejido articular de modelos animales, casos y controles de poblaciones humanas que estudian interacciones entre genes de vías moleculares específicas, también epistasis entre pares en pacientes del sexo femenino y estudios de interacción genética en GWAS.

En el caso de modelos animales, se estudió el perfil *in silico* de la interacción entre genes importantes para el desarrollo de OA en ratas, encontraron que genes como *Met*, *Ubb*, *Gnai3* y *Gna13*, mantenían una relación con el desarrollo de OA en el cartílago de rata, lo cual fue corroborado con ensayos de qRT-PCR (Ren *et al.*, 2018).

En cuanto a estudios en humanos, en una muestra de casos con OA de rodilla y controles taiwaneses, se identificó un modelo de interacción significativo entre dos *loci* relacionados con la vía molecular de TGF β , compuesto por rs6494629/rs715572 (*SMAD3/TIMP3*) con el método MDR (Su *et al.*, 2015a). En otro estudio se encontró asociación estadísticamente significativa en interacciones entre los pares de genes de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, rs3739262/rs2615977 (*WISP1/COL11A1*), rs2615977/rs409238 (*COL11A1/FRZB*), y rs409238/rs851054 (*FRZB/SOST*), además de la interacción rs3739262/rs986690 (*WISP1/FMN2*), en una muestra de la Ciudad de México y otra de Guadalajara, Jalisco, respectivamente (Fernández *et al.*, 2018a). También se encontró asociación entre la interacción rs1501299/rs662 (*ADIPOQ/PON1*) con OA de rodilla, ambos genes relacionados con las vías del estrés oxidativo (Fernández *et al.*, 2019). Además, la interacción

entre los genes de la vía de HIF1, rs8100018/rs2288377 (*AKT2/IGF1*) también se ha asociado al desarrollo de OA de rodilla (Fernández-torres *et al.*, 2019a).

Considerando la alta frecuencia de OA en el sexo femenino, es importante investigar el tipo de interacciones epistáticas que pudiesen estar involucradas con la patogenia en su contexto biofisiológico particular. De esta manera, existe evidencia de dos estudios de casos y controles hechos en una población finlandesa en los cuales se observa asociación significativa con OA de mano con las interacciones rs3815148/rs10953541 (*COG5/BCAP29*) y rs1799945/rs9340799 (*HFE/ESR1*), además de variantes genéticas asociadas a las vías inflamatorias rs1799964/rs1805015 (*TNFA/IL4R*), rs1799964/rs1800896 (*TNFA/IL10*) y rs1800630/rs1800896 (*TNFA/IL10*) (Hämäläinen, Solovieva, Vehmas, Leino-Arjas, *et al.*, 2014a; Hämäläinen, Solovieva, Vehmas, Luoma, *et al.*, 2014).

También existe un reporte de GWAS en el que se buscó asociación significativa de interacciones entre variantes genéticas, en el contexto de 10 enfermedades crónicas entre las que se incluyó OA (Murk and Dewan, 2016). Para el análisis de epistasis, ellos usaron dos diferentes softwares normalmente usados para analizar cantidades muy grandes de variantes genéticas, FastEpistasis y BOOST; en el análisis con FastEpistasis se encontró asociación con OA de dos posibles interacciones, rs7316595/rs2066936 (*TSPAN15/ZNF773*) y rs272051/rs7630522 (*2:115862079/LINC01990*); mientras que en el análisis con BOOST se observó una asociación significativa con rs4408841/rs4858960 (*3:87424276/MDFIC2*).

Es claro que la epistasis es un fenómeno presente en la patogenia de OA de rodilla y que las interacciones entre pares, principalmente cuando se trata de genes de la misma vía metabólica. Sin embargo, son pocos los estudios que han estudiado la epistasis entre genes de diferentes vías metabólicas asociadas a OA, así como interacciones genéticas de alto orden. Es necesario profundizar más en el papel que juega este tipo de epistasis en el desarrollo de OA de rodilla en nuestra población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La OA es una enfermedad frecuente en la que se han descrito diferentes factores de riesgo tales como obesidad, edad, actividad física entre otros. Está demostrado que los factores hereditarios contribuyen alrededor de 60% de la variabilidad del fenotipo de OA, y, diversos estudios han demostrado que las variantes de algunos genes relacionados con el metabolismo articular se encuentran relacionados con el incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad; por lo que debemos considerarla una enfermedad poligénica. Así mismo, se ha demostrado que la epistasis es un fenómeno que juega un papel importante en su patogénesis. Sin embargo, aunque pocos, la mayoría de estos estudios se han enfocado a analizar asociaciones entre interacciones entre pares de genes que participan en vías comunes.

Por otra parte, Los genes *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1*, participan en distintas vías moleculares que regulan diferentes procesos como, inflamación, formación de MEC, osificación endocondral, entre otras. Todos estos procesos participan en el daño al tejido articular y existe evidencia de su actividad en conjunto durante el desarrollo de OA de rodilla. Considerando que el fenómeno de epistasis puede ampliarse al efecto que puede tener una variante de un gen sobre otra de distinta vía metabólica, pensamos que las variantes de un solo nucleótido de los genes *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* podrían asociarse a OA de rodilla e interactuar entre sí para ejercer su efecto sobre este fenotipo. Hasta donde tenemos conocimiento, no existen reportes de la literatura donde se haya analizado la asociación de estas variantes genéticas y su interacción, con OA primaria de rodilla, en la población mexicana.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre las variantes de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1*, así como sus interacciones gen-gen con el desarrollo de OA primaria de rodilla en pacientes mexicanos?

JUSTIFICACIÓN

La OA es una enfermedad altamente incapacitante que generalmente afecta a la población mayor de 40 años, muchos de los afectados aún son personas productivas. Según cálculos realizados en un estudio de costos llevado a cabo en el Instituto Mexicano del Seguro Social, el costo de la atención

a pacientes con OA de rodilla, a nivel nacional podría ascender a los \$27,385,761,279 mxn (Villarreal-Ríos *et al.*, 2019). En el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) es una de las entidades que se presentan con mayor frecuencia ocupando el tercer lugar como causa de atención (datos institucionales).

Debido a la alta frecuencia con que se presenta esta entidad es necesario el estudio de asociación con genes probablemente implicados en la enfermedad para conocer cuáles de ellos se asocian con ella en nuestra población y cuando se presenta interacción entre sus variantes. Una vez determinadas las asociaciones se podrá continuar con investigaciones que determinen los mecanismos mediante los cuales intervienen tales factores en el desarrollo de la OA. El conocimiento de la epistasia en OA tiene amplias implicaciones para el cuidado de la salud y la medicina personalizada, debido a que puede ayudar a predecir como los tejidos y los pacientes van a responder a un tratamiento en particular, así como a aplicaciones biotecnológicas potenciales, por ejemplo, determinar la estructura tridimensional de las macromoléculas involucradas con su patogenia.

HIPÓTESIS

Existe asociación entre las variantes de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* y sus interacciones gen-gen con el desarrollo de OA primaria de rodilla en pacientes mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de las variantes de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* y sus interacciones gen-gen con el desarrollo de OA primaria de rodilla en pacientes mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Estudio de casos y controles no pareado.

Población

Pacientes que acudieron al INR con diagnóstico de OA de rodilla, incluyendo casos prevalentes y casos incidentes. Los casos prevalentes fueron aquellos en los que el diagnóstico se realizó antes del inicio del estudio, que continuaron acudiendo a la consulta y cumplieron con los criterios para ingresar al estudio. Los casos incidentes fueron aquellos cuyo diagnóstico se realizó a partir del inicio del estudio y que cumplieron con los criterios para ingresar al estudio.

Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión de los casos:

- Masculino o femenino.
- Diagnóstico clínico de OA de rodilla.
- Clasificación radiológica KL ≥ 2 .
- IMC ≤ 28 kg/m².
- 50 años de edad o más al momento de diagnóstico de la OA.
- Diagnóstico de OA establecido o confirmado en el INR.

Criterios de exclusión de los casos:

- Antecedentes de traumatismos severos y cirugías de rodilla previos al diagnóstico de OA.
- Enfermedades congénitas o del crecimiento.
- Otras enfermedades articulares y óseas; por ejemplo, artritis reumatoide, gota, psoriasis, displasia ósea, artritis séptica.

Criterios de inclusión de los controles:

- Masculino o femenino.
- 50 años de edad o más al momento del inicio del estudio.
- Sin diagnóstico de OA de rodilla.

- Escala de KL <2.

Criterios de exclusión de los controles:

- Enfermedades congénitas o del crecimiento.
- Otras enfermedades articulares y óseas; por ejemplo, artritis reumatoide.

Definición de las variables

Variable dependiente: Diagnóstico radiológico de OA primaria de rodilla mediante la escala de KL.

Variable independiente: Genotipo de las SNV de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* determinado por PCR en tiempo real.

Variables demográficas: sexo referido, edad en años.

Variables de riesgo: índice de masa corporal en kg/m², tabaquismo referido, alcoholismo referido, traumatismos directos previos referidos, ocupación de riesgo, actividad deportiva de riesgo, antecedentes familiares OA u otras enfermedades crónicas, enfermedades crónicas concomitantes.

La definición operativa y codificación de las variables se presentan en la sección de *Descripción de los procedimientos* (más adelante) y en la tabla 1.

Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra requerido para nuestro estudio se calculó con la fórmula de Schlesselman para diseño de casos y controles no pareados con un control por caso (Schlesselman, 1982), mediante el uso del software PS Power and Sample Size Calculations ©, versión 3.0. Tomamos en cuenta la probabilidad de exposición para el alelo menor de rs25648 de *VEGF*, el cual reportó una frecuencia del alelo menor en controles de 17% en la población mexicana durante un estudio de cáncer de vejiga reportado previamente (Garza-Veloz, Castruita-De la Rosa, *et al.*, 2011), además un supuesto RM de 2, error alfa de 0.01 y poder del 90%. El análisis del software nos describió que, en el supuesto de que el riesgo de exponerse a nuestra variable de riesgo por parte del grupo de casos fuese 2 veces mayor (RM= 2) que el grupo control, necesitaríamos estudiar 360 casos y 360

controles para poder rechazar la hipótesis nula de que no hay diferencia entre los grupos estudiados con un poder estadístico del 90% y una probabilidad de cometer error tipo I del 1%.

Análisis estadístico

Se analizó la estadística descriptiva de todas las variables y se contrastó hipótesis usando la prueba de χ^2 , la prueba t de Student o el test de rangos de Wilcoxon, dependiendo del tipo de variable y su distribución. Se realizó un análisis de regresión logística no condicional, estimando la razón de momios y sus intervalos de confianza de 95% (IC95%) a través del exponencial de los coeficientes de regresión en forma univariada y multivariada. Para construir el modelo multivariado se incluyeron las variables que en el análisis univariado cuando mostraron un valor de $p \leq 0.05$.

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de las SNV estudiadas en la muestra. Posteriormente, se usó la calculadora Courtlab-HW en Excel para medir el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en el grupo control para cada variable genética. Después se analizó la asociación genética entre las SNV con OA de rodilla, con los modelos de asociación genética dominante, recesivo, codominante y aditivo, usando el software STATA v.11.1 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). El modelo dominante supone que una sola copia del alelo menor (por ejemplo *a*, en *Aa*) es suficiente para modificar el riesgo y portar 2 copias lo modifica en igual magnitud (*Aa+aa* vs *AA*). En el modelo recesivo se compara el riesgo de portar un genotipo homocigoto para el alelo menor en comparación con portar una o ninguna copia (*aa* vs *Aa+AA*). El modelo aditivo supone que cada copia del alelo modifica el riesgo en una cantidad aditiva, es decir, los homocigotos *aa* tienen el doble de riesgo que los heterocigotos *Aa*. Mientras tanto, el modelo codominante proporciona un riesgo diferente para cada genotipo de forma independiente (Iniesta, Guinó and Moreno, 2005).

En la muestra final, también se hizo un análisis estratificado de la muestra de casos por la severidad de OA de rodilla, para analizar las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas con el grupo control. Así mismo, todos los resultados del análisis de asociación genética en cada modelo

de herencia estudiado se ajustaron en un modelo de análisis multivariado por regresión logística con las variables de riesgo que resultaron asociadas con el fenotipo de OA de rodilla.

En el caso de las SNV que se encontraban en el mismo gen, analizamos la presencia de desequilibrio de ligamiento y, en su caso, analizamos la asociación de los haplotipos con OA de rodilla; para esto nos apoyamos con el uso del software Haploview, versión 4.1 (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts). Este software funciona introduciendo la variable de clasificación (casos OA vs controles) y los datos genotípicos de cada paciente con sus alelos por separado (una columna para cada alelo de las variantes analizadas), además del locus de cada una de las variantes que se analizarán. Esto permite el cálculo de estadísticos como el LOD score, para evaluar desequilibrio de ligamiento entre las variantes, y la formación de bloques de haplotipos para el análisis de asociación con el fenotipo. Consideramos desequilibrio de ligamiento cuando variantes cercanas presentaron un LOD score igual o mayor a 3, así como una D' igual o mayor a 0.6, así mismo, consideramos una asociación significativa de los haplotipos con OA de rodilla cuando el valor de p fue 0.05 o menor.

Para evaluar la interacción gen-gen usamos el método de Reducción de la Dimensionalidad Múltiple (MDR) (Moore and Andrews, 2015). Como se mencionó previamente, MDR es un software de minado de datos que utiliza un método libre de parámetros (no paramétrico) y de modelo de herencia (libre de modelo), el cual permite analizar la interacción entre grandes dimensiones de variables al reducir las dimensiones a formas dicotómicas de tipo alto y bajo riesgo, de acuerdo a la frecuencia de los alelos de riesgo en los casos y los controles. Tradicionalmente, MDR lleva a cabo una búsqueda exhaustiva de todas las combinaciones de atributos de 2 y 3 vías. Para reducir la multidimensionalidad de estas combinaciones de atributos, MDR se apoya en la inducción constructiva, mediante la cual se diseña una variable dicotómica de alto y bajo riesgo a partir de las frecuencias de casos y controles en cada una de las combinaciones genotípicas entre las variantes genéticas estudiadas. Dicho de otra manera, en la variable dicotómica resultante, la categoría de “alto riesgo” está representada por todas las casillas de combinación de genotipos en las que la frecuencia de casos fue mayor a la de controles (casillas de alto riesgo) y la categoría de “bajo riesgo” por las casillas en las que la frecuencia de controles fue mayor. Este método nos permite evaluar la

interacción entre las variantes genéticas de una manera más amplia, en lugar de las limitaciones que conlleva analizar cada una de las interacciones genotipo/genotipo por separado.

Para su interpretación, MDR reporta una tabla con los datos de validación cruzada correspondientes a los mejores modelos de 1, 2, 3 y 4 *loci*, mismos que se encuentran expuestos en su primera columna. En una segunda columna se muestra el promedio de la precisión a través de los intervalos de validación cruzada (VC), lo que se denomina precisión de entrenamiento de VC. Este es el parámetro que usa el software para elegir el mejor modelo de interacción. El mejor modelo de cada intervalo de VC se aplica a una porción de prueba de los datos para derivar en la precisión de prueba, el factor sugerido para escoger el mejor modelo. Los estimados de precisión se promedian a través de los intervalos de VC. Se puede considerar que una precisión de prueba de al menos 0.55 es interesante para analizar; también que los valores de 0.60 o mayores son casi siempre significativos. Se debe tomar en cuenta que una precisión de prueba de 0.50 es lo que esperarías para predecir casos y controles lanzando una moneda al aire. En la última columna de la tabla se reporta la consistencia de la VC, es decir, las veces que se obtuvo un resultado similar en los subgrupos de la muestra; generalmente se divide en 10 partes, siendo 10/10 el valor deseado.

El software también proporciona un análisis gráfico de la distribución de combinaciones de genotipos de las variantes estudiadas, el cual da una idea respecto a un posible efecto no-lineal, esto es cuando varían las casillas de alto y bajo riesgo entre las filas y columnas; por el contrario, un efecto individual fuerte se mostraría acentuado en una columna o fila en específico y no variaría el efecto entre los otros genotipos.

Para una mejor interpretación del efecto de los componentes analizados, MDR también reporta la ganancia de información (GI) del mejor modelo de interacción, es decir, cuanta información se gana con el conocimiento de la interacción entre los genes respecto al estatus de caso o control. Si la combinación de los genotipos de las variantes genéticas aporta GI positiva se trata de una interacción sinérgica; por otra parte, si la información se pierde (es negativa) significa redundancia o correlación entre las variantes (p. ej. Desequilibrio de ligamiento). En caso de que no haya ganancia ni pérdida de información se sugiere que las variantes tienen efectos independientes. El software permite la

representación de esta información en forma de distintos tipos de gráficas, entre las que se encuentra el dendograma. En el dendograma se representa la fuerza de interacción entre las variables dependiendo de la distancia entre las líneas que las unen, a menor distancia mayor fuerza de interacción. A su vez, el color de la línea que une las variantes indica el tipo de interacción: Rojo y naranja indican epistasis; el color amarillo sugiere independencia; mientras que verde y azul significan redundancia o correlación. Los otros tipos de gráficas en los que se puede presentar la información presentan la ventaja de poder observar la GI de los efectos marginales de cada variante genética y de las interacciones entre pares.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Este estudio fue aprobado por los comités de investigación y ética del INR, quedando registrado ante dichas instancias con el número de proyecto 24/17. Aunque la toma de muestra sanguínea confiere un riesgo mínimo, para incluir a los casos se entrevistó a los pacientes para invitarlos a participar y sólo se incluyeron cuando dieron su consentimiento en forma libre e informada. Se explicó de forma sencilla y comprensiva la naturaleza del estudio y la necesidad de la toma de muestra sanguínea, no se ejerció ningún tipo de presión para convencerlos de su colaboración. Quienes aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento diseñada previamente de acuerdo a los criterios institucionales (anexos I y II). Así mismo, cuando se detectó un probable control, se procedió de la misma forma que con los casos, y sólo quienes aceptaron participar ingresaron al estudio, sin intervenir en su decisión y firmando la carta de consentimiento. Los participantes que así lo solicitaron fueron informados acerca de sus resultados radiológicos y se les asesoró para que recibieran la atención pertinente cuando fue necesario. Toda la información personal que se recabó fue tratada como confidencial y solo se usó para contactar al paciente en caso de haber sido acordado previamente con ella/él.

Descripción de los procedimientos

Clasificación radiológica de los sujetos de estudio

Se incluyeron a los pacientes que, previo consentimiento informado, aceptaron participar en el estudio. Todos los sujetos que aceptaron participar contestaron un cuestionario (anexo III) para la obtención de datos generales, antecedentes y datos clínicos. Posteriormente, se obtuvo una muestra de sangre periférica de aproximadamente 5 ml y se realizó una radiografía de rodilla. La imagen de rayos X se clasificó por un médico radiólogo completando un formato elaborado para este propósito (anexo IV), de acuerdo a los criterios propuestos por Kellgren y Lawrence (Kellgren and Lawrence, 1957), en todos los sujetos. Los datos radiológicos que se consideraron como evidencia de OA fueron:

- a) Formación de osteofitos en las márgenes articulares, o en el caso de la rodilla en la espina tibial.
- b) Huesecillos periarticulares.
- c) Estrechamiento del cartílago articular asociado a esclerosis del hueso subcondral.
- d) Áreas pseudoquísticas pequeñas con paredes escleróticas situadas de ordinario en el hueso subcondral.

Graduación de la osteoartritis:

Grado 0 (Ausente):	Sin alteraciones.
Grado 1 (Dudosa):	Disminución dudosa del espacio articular y osteofitos posibles en los bordes.
Grado 2 (Mínima):	Osteofitos definitivos y disminución posible del espacio articular.
Grado 3 (Moderada):	Osteofitos múltiples moderados, disminución definitiva del espacio articular y cierta esclerosis y deformación ósea terminal posible.
Grado 4 (Intensa):	Grandes osteofitos, disminución acentuada del espacio articular, esclerosis intensa y deformación ósea terminal definitiva.

Genotipificación de los individuos

Para la selección de las SNV estudiadas se tomaron en consideración distintos criterios, principalmente una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor a 5% en las bases de datos; todas las SNV seleccionadas cumplen con esta característica en las distintas poblaciones de las bases revisadas, en general, y en la población mexicana mestiza, en particular, excepto por rs1146031 (presentó una MAF de 3% en mestizos mexicanos), rs1676486 y rs227861 (estos últimos no tienen reportes de prevalencia en esta población). Incluir variantes de baja prevalencia en nuestra población ayuda a nuestro estudio para ampliar el panorama de interacción con variantes poco estudiadas que podrían tener un efecto significativo en el fenotipo o en la interacción con otras moléculas. En cuanto a la localización, escogimos 4 SNV localizadas en las regiones codificantes de sus genes (rs25648, rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs2227861), además de 2 variantes (rs2167270 y rs2010963) localizadas en regiones reguladoras no traducidas de la región 5' (5'UTR). En cuanto a las variantes en regiones codificantes, rs1676486 y rs3753841, estas fueron seleccionadas porque producen cambios de aminoácido en la estructura proteica, Ser>Pro y Pro>Leu, respectivamente; mientras que rs25648, rs1146031 y rs2227861, aunque no provocan ningún cambio de aminoácido en la proteína, el cambio de nucleótido que representan podría afectar la estructura secundaria del RNA o cumplir con una función de marcador de una región asociada a OA de rodilla. Escogimos dos SNV de los genes *VEGF*, *COL11A1*, y *ACVR1*, porque esto nos permitirá evaluar, tanto la implicación de una región con el desarrollo de OA al formar haplotipos, como la posibilidad de evaluar epistasis entre variantes dentro de la estructura del mismo gen. También escogimos a rs2167270, considerando la evidencia de su efecto en la expresión del gen *LEP*. Todas estas variantes han mostrado una amplia reproducibilidad a través de distintos estudios y con distintas técnicas moleculares, incluyendo los ensayos de genotipificación con sondas Taqman®. Por último, con excepción de rs2010963, ninguna de las variantes seleccionadas ha sido estudiada en la población mexicana por su probable asociación con OA de rodilla (tabla 2).

Para el proceso de genotipificación, se extrajo DNA de leucocitos de sangre venosa periférica, con el empleo de un kit de extracción Puregene Blood Core Kit B (Quiagen, Valencia, CA, USA). Cada

muestra se almacenó a -20°C hasta su uso. Para la reacción de PCR en tiempo real, se usaron cebadores y sondas Taqman® previamente diseñadas de cada una de las SNV seleccionadas (ID de los ensayos: C_15966471_20, C_8311614_10, C_8400671_30, C_791476_10, C_2947954_20, C_7544931_20, y C_15956742_10, de las SNV rs2167270, rs2010963, rs1676486, rs25648, rs3753841, rs1146031 y rs2227861, respectivamente, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para la reacción, se usó un kit de genotipificación con sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y un termociclador Rotor-Gene Q (Quiagen, Germantown, Maryland, USA). La genotipificación con sondas Taqman® tiene como fundamento el hecho de que estas sondas en su estructura contienen un fluoróforo y al mismo tiempo un inhibidor de fluorescencia, también denominado “quencher”. Al unirse por complementariedad de bases a la variante alélica de interés en el DNA de una sola cadena, el “quencher” inhibe la liberación del fluoróforo hasta que una DNA polimerasa lo separe de la cadena a la que se encuentra adherido. Esto permite la liberación del fluoróforo, cuya fluorescencia puede ser detectada y discriminada por un equipo de PCR en tiempo real en razón de su longitud de onda, indicando la amplificación de tal o cual alelo (Scientific, no date). Al final del análisis cada sujeto de estudio es clasificado de acuerdo al número de copias de cada alelo estudiado, de tal manera que puede ser categorizado como: homocigoto wild type (AA), heterocigoto (Aa), u homocigoto para la variable “mutada” (aa), lo cual se codificará en la base de datos de acuerdo al modelo de herencia o el método de análisis con el cuál se contrastaron hipótesis en el análisis estadístico.

Tabla 1. Definición operativa de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Escala de medición	Codificación
Osteoartritis de rodilla ^a	Patología articular, crónico-degenerativa, caracterizada por degradación del CA, deformación del HS y sinovitis leve	Escala radiográfica de OA de Kellgren y Lawrence 0= ausente 1= dudosa 2= leve 3= moderada 4= severa	Dicotómica	0 a 1= 0 (control) 2 a 4= 1 (caso)
Polimorfismos de los genes LEP, VEGF, COL11A1 y ACVR1 ^b	Variantes de un solo nucleótido en la secuencia de DNA que codifica para los genes LEP, VEGF, COL11A1 y ACVR1	Genotipo de acuerdo a los resultados de PCR en tiempo real de los ensayos con sondas Taqman®: <i>Ensayo: polimorfismo</i> C_15966471_20: rs2167270 C_8311614_10: rs2010963 C_8400671_30: rs1676486 C_791476_10: rs25648 C_2947954_20: rs3753841 C_7544931_20: rs1146031 C_15956742_10: rs2227861	Nominal	<i>Modelos de asociación genética</i> <i>Alélico</i> N= 0 n= 1 <i>Codominante</i> NN+nn= 0 Nn= 1 y NN+Nn= 0 <i>Dominante</i> NN= 0 Nn+nn= 1 <i>Recesivo</i> NN+Nn= 0 nn= 1 <i>Aditivo</i>

				<i>nn</i> = 1	<i>NN</i> = 0
					<i>Nn</i> = 1
					<i>nn</i> = 2
Sexo ^c	Características anatómicas y fisiológicas relacionadas con las gónadas femeninas y masculinas	Sexo genital referido por paciente como femenino o masculino	Dicotómica	Masculino= 0 Femenino= 1	
Edad ^c	Tiempo de vida desde el nacimiento hasta la fecha actual	Años cumplidos	Cuantitativa	50, 51, 52...	
IMC ^d	Peso distribuido sobre la superficie corporal	Se calcula dividiendo el peso del paciente en kilogramos sobre su estatura al cuadrado en metros (kg/m ²)	Cuantitativa	20.1, 20.2, 20.3...	
Tabaquismo ^e	Habito del consumo de productos del tabaco	Referido por paciente como el consumo previo o actual de productos del tabaco	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1	
Alcoholismo ^e	Hábito del consumo de bebidas alcohólicas	Referido por paciente como el consumo previo o actual de productos del tabaco	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1	
Ocupación de riesgo ^e	Ocupaciones laborales que se han asociado significativamente con un incremento en el riesgo de desarrollar OA	Práctica laboral actual o previa, de alta demanda articular, por ejemplo, cargador, construcción, minería, jornalero, principalmente)	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1	

Actividad deportiva de riesgo^e	Actividades deportivas que se han asociado significativamente con un incremento en el riesgo de desarrollar OA	Actividad deportiva actual o previa, de alta demanda articular, por ejemplo, entrenamiento profesional o de alto rendimiento, actividad deportiva recreativa pero con demanda articular como futbol soccer, basquetbol, halterofilia, maratón, correr sobre pavimento, principalmente)	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1
DMT2^e	Diagnóstico previo de DMT2 como enfermedad concomitante	Diagnóstico previo de DMT2 hecho por facultativo, referido por el paciente	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1
HAS^e	Diagnóstico previo de HAS como enfermedad concomitante	Diagnóstico previo de HAS hecho por facultativo, referido por el paciente	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1
Cardiopatía^e	Diagnóstico previo de Cardiopatía como enfermedad concomitante	Diagnóstico previo de cardiopatía hecho por facultativo, referido por el paciente	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1
Cáncer^e	Diagnóstico previo de cáncer como enfermedad concomitante	Diagnóstico previo de cáncer asociado con los polimorfismos estudiados, por ejemplo, colorrectal, hepatocelular, vejiga, cáncer gástrico, principalmente.	Dicotómica	Negativo= 0 Positivo= 1

^a variable dependiente

^b variable independiente

^c datos demográficos

^d medidas antropométricas

° antecedentes de riesgo

IMC índice de masa corporal

DMT2 diabetes mellitus tipo 2

HAS hipertensión arterial sistémica

Tabla 2. Características de las variantes genéticas analizadas en nuestro estudio

SNV	Gen	Región	Localización ^a	Nucleótido	Aminoácido	mAF/mAF ^b
rs2167270	LEP	5'UTR	7:128241296	G>A	-	0.34/0.50
rs2010963	VEGF	5'UTR	6:43770613	C>G	-	0.32/0.43
rs25648	VEGF	Codificante	6:43771240	C>T	Ser>Ser	0.12/0.21
rs1676486	COL11A1	Codificante	1:102888582	A>G	Ser>Pro	0.21/ND
rs3753841	COL11A1	Codificante	1:102914362	C>T	Pro>Leu	0.49/0.24
rs1146031	ACVR1	Codificante	2:157770468	G>A	Glu>Glu	0.08/0.03
rs2227861	ACVR1	Codificante	2:157780398	C>T	Ala>Ala	0.34/ND

SNV Variante de un solo nucleótido

mAF Frecuencia del alelo menor (base de datos SNP de la National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

^a Localización de acuerdo a GRCh38

^b Población mestiza latinoamericana

^c mAF Población mexicana, obtenido de (Garza-Veloz, Rosa, *et al.*, 2011)

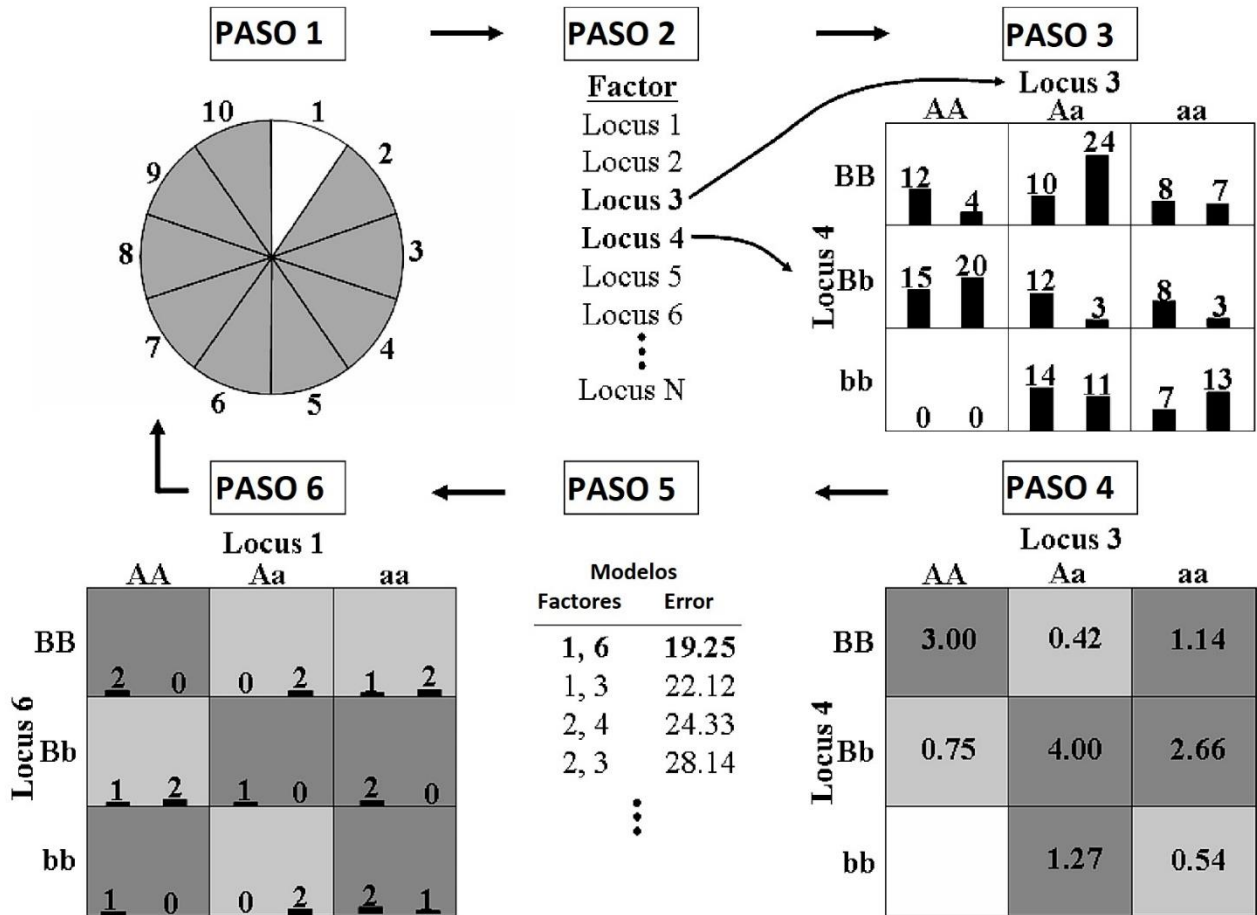


Figura 1. **Resumen de los pasos generales del método MDR (traducido y adaptado de Motsinger y Ritchie, 2005).**

En el paso 1, los datos se dividen en un set de entrenamiento y un set independiente de prueba para una validación cruzada. En el paso 2, un set de n factores se selecciona del pool de todos los factores. En paso 3, los n factores seleccionados y sus posibles casillas multifactoriales se representan en un espacio dimensional a n. En el paso 4, cada casilla multifactorial de la dimensionalidad espacial n es clasificada como alto riesgo si la razón de individuos afectados/no afectados excede 1, y como bajo riesgo si no lo excede. En los pasos 5 y 6, el modelo con menor error de clasificación se selecciona y el error de predicción del modelo se estima usando los datos de la muestra independiente. Los pasos del uno al seis se repiten para cada intervalo de validación cruzada posible. Las barras representan la distribución hipotética de casos (izquierda) y controles (derecha) de cada combinación multifactorial. Las casillas grises oscuro representan combinaciones genotípicas de alto riesgo, mientras que las de color gris claro son combinaciones de bajo riesgo. Las casillas blancas representan combinaciones de las que no se observó ningún dato.

RESULTADOS

Se obtuvieron resultados en dos momentos de la investigación. Se realizó un primer corte, donde se estudió la asociación de las variantes de *LEP* (rs2167270), *VEGF* (rs2010963) y *COL11A1* (rs1676486) con OA y se analizó la asociación de interacciones entre estos en una muestra parcial de 294 sujetos de estudio. Posteriormente, se realizó un análisis final en el cual se estudió la asociación del resto de las variantes de *VEGFA* (rs25648), *COL11A1* (rs1676486 y rs3753841) y *ACVR1* (rs1146031 y rs2227861) en la muestra total del estudio que constó de 879 sujetos. Debido a esto, se presentan los resultados por separado.

Resultados de la muestra parcial

Análisis de asociación de rs2167270 (LEP), rs2010963 (VEGF), y rs1676486 (COL11A1) con OA de rodilla

En la muestra parcial, se estudiaron 107 casos con OA de rodilla confirmada por radiografía (40.2% leves, 24.3% moderados, y 35.5% severos) y 187 controles sin OA radiológica de rodilla (tabla 3). Aproximadamente, el 73% de los casos y el 67% de los controles son personas de sexo femenino ($p= 0.28$). Por otra parte, los casos fueron significativamente mayores en edad que los controles (67.1 ± 10.16 vs 62.1 ± 11.02 años, respectivamente; $p < 0.01$); mientras que no se encontraron diferencias significativas en el IMC ($25.9\pm 2.75\text{kg/m}^2$ vs $25.3\pm 2.79\text{kg/m}^2$; valor de $p= 0.18$), aunque fue ligeramente mayor en los casos (25.9% vs 25.3%). Además, se encontró un incremento estadísticamente significativo (valor de $p= 0.04$) en la frecuencia de HAS en el grupo de casos (42.1%) comparado con el grupo control (29.9%). También se encontró un incremento no significativo en la frecuencia de tabaquismo y alcoholismo en los controles (11.2% vs 15%, y 16.8% vs 19.8%, respectivamente) comparado con los casos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la ocupación o actividad deportiva de riesgo ($p= 0.07$, y $p= 0.24$, respectivamente), aunque paradójicamente se encontraron incrementadas en el grupo de controles. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la prevalencia de enfermedades concomitantes como

DMT2, cardiopatías o cáncer ($p > 0.05$). En la muestra, la media del conocido factor de riesgo edad y la frecuencia relativa de la enfermedad concomitante HAS son significativamente diferentes entre los grupos, por lo que serán usados para ajustar los diferentes modelos de herencia en el análisis multivariado de asociación genética.

Tabla 3. Características de la muestra parcial del estudio

Variable	Casos (n=107)	Controles (n=187)	p
<i>Edad (años, media±DE)</i>	67.06±10.16	62.08±11.02	<0.01^a
<i>IMC (kg/m², media±DE)</i>	25.88±2.75	25.29±2.79	0.18 ^a
<i>Sexo femenino (n, %)</i>	78 (72.90)	125 (66.84)	0.28
<i>Tabaquismo (n, %)</i>	12 (11.21)	28 (14.97)	0.37
<i>Alcoholismo (n, %)</i>	18 (16.82)	37 (19.79)	0.53
<i>Ocupación laboral</i>			
<i>Actual (n, %)^b</i>	29 (27.10)	70 (37.43)	0.07
<i>Anterior (n, %)^c</i>	50 (87.72)	90 (90.91)	0.53
<i>Actividad deportiva</i>			
<i>Actual (n, %)^b</i>	20 (18.69)	46 (24.60)	0.24
<i>Anterior (n, %)^c</i>	52 (48.60)	92 (49.20)	0.92
<i>Enfermedades concomitantes</i>			
<i>Diabetes mellitus tipo 2 (n, %)</i>	27 (25.23)	31 (16.58)	0.07
<i>HAS (n, %)</i>	45 (42.06)	56 (29.95)	0.04
<i>Cardiopatía (n, %)</i>	8 (7.48)	15 (8.02)	0.87
<i>Cáncer (n, %)</i>	5 (4.67)	10 (5.35)	0.80
<i>Clasificación radiológica</i>			
<i>G0 (n, %)</i>	-	152 (81.28)	
<i>G1 (n, %)</i>	-	35 (18.72)	
<i>G2 (n, %)</i>	43 (40.19)	-	
<i>G3 (n, %)</i>	26 (24.30)	-	
<i>G4 (n, %)</i>	38 (35.51)	-	

n Tamaño de la muestra

IMC Índice de Masa Corporal

HAS Hipertensión Arterial Sistémica

^a Prueba de suma de rangos de Wilcoxon debido a que presentó una p<0.05 en el test Shapiro-Francia (datos no mostrados)

^b Se refiere a si la actividad es realizada a la fecha de reclutamiento en el estudio

^c Se refiere a si la actividad fue realizada previamente y ya no se realiza a la fecha de reclutamiento del estudio

Negritas valor estadísticamente significativo p< 0.05

Al analizar los resultados de la genotipificación por PCR en tiempo real, se observó que la mAF de las variantes rs2167270 (45.1%) y rs2010963 (38.4%) están en EHW en el grupo control ($p= 0.17$, y $p=0.59$, respectivamente). Por otra parte, rs1676486 no se encontró en EHW en el grupo de controles (mAF= 13.4%; $p= 0.04$), por lo que los resultados de su análisis no se consideraron suficientemente válidos en esta parte del estudio. Aun así, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de rs2167270 o rs2010963, entre los casos y controles (tabla 4). De la misma manera, al evaluar los modelos de asociación genética codominante, dominante, recesivo y aditivo, tampoco hubo diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de rs2167270 y rs2010963 entre los pacientes con OA de rodilla y los controles (tabla 5). De forma interesante, el rs1676486 presentó un valor de p menor a 0.05, al encontrarse incrementada la frecuencia del alelo A en el grupo control a expensas de diferencias significativas en las frecuencias del genotipo GA en el análisis del modelo de herencia codominante (19.1 vs 26.8%; $p= 0.03$); sin embargo, los resultados de su análisis no son válidos por no encontrarse en EHW.

Tabla 4. Distribución de las frecuencias alélicas los polimorfismos rs2167270 (*LEP*), rs2010963 (*VEGF*) y rs1676486 (*COL11A1*) con OA de rodilla en la población Mexicana

SNV	Alelo	Casos (n=107)	Controles (n=184)	RM (IC95%)	p	pEHW
<i>rs2167270</i>						
	G	106 (49.53)	202 (54.89)	1.00		0.17
	A	108 (50.47)	166 (45.11)	1.23 (0.87-1.76)	0.21	
<i>rs2010963</i>						
	T	138 (65.71)	228 (61.62)	1.00		0.59
	C	72 (34.29)	142 (38.38)	0.82 (0.57-1.21)	0.32	
<i>rs1676486</i>						
	G	184 (87.62)	317 (86.61)	1.00		0.04 ^a
	A	26 (12.38)	49 (13.39)	0.91 (0.52-1.55)	0.79	

SNV variante de un solo nucleótido

pEHW valor de p de equilibrio de Hardy-Weinberg

^a el polimorfismo no se encuentra en EHW en el grupo control

Tabla 5. Asociación de los genotipos de rs2167270 (*LEP*), rs2010963 (*VEGF*) y rs1676486 (*COL11A1*) con OA de rodilla en la población Mexicana

SNV	Modelo	Genotipo	Casos (n=107)	Controles (n=184)	RM (IC95%)	p	RM (IC95%) ^a	p ^a
<i>rs2167270</i>	<i>Co</i>	<i>GG</i>	30 (28.04)	60 (32.61)	1.00		1.0	
		<i>GA</i>	46 (42.99)	82 (44.57)	1.12 (0.64-1.98)	0.47	1.07 (0.60-1.91)	0.52
		<i>AA</i>	31 (28.97)	42 (22.83)	1.48 (0.78-2.79)		1.43 (0.74-2.76)	
	<i>Do</i>	<i>GA/AA vs GG</i>	77 (71.96)	124 (67.39)	1.24 (0.74-2.09)	0.41	1.19 (0.70-2.04)	0.52
	<i>Re</i>	<i>AA vs GG/GA</i>	31 (28.97)	42 (22.83)	1.38 (0.80-2.37)	0.25	1.38 (0.79-2.40)	0.26
	<i>Ad</i>				1.21 (0.88-1.67)	0.24	1.19 (0.86-1.66)	0.29
<i>rs2010963</i>	<i>Co</i>	<i>TT</i>	44 (0.42)	72 (38.92)	1.00		1.00	
		<i>TC</i>	50 (0.48)	84 (45.41)	0.97 (0.58-1.63)	0.45	0.97 (0.57-1.65)	0.66
		<i>CC</i>	11 (0.1)	29 (15.68)	0.62 (0.28-1.37)		0.70 (0.31-1.56)	
	<i>Do</i>	<i>TC/CC vs TT</i>	61(58.1)	113 (61.08)	0.88 (0.54-1.44)	0.62	0.90 (0.55-1.49)	0.69
	<i>Re</i>	<i>CC vs TT/TC</i>	11(10.5)	29 (15.68)	0.63 (0.30-1.32)	0.21	0.71 (0.33-1.51)	0.36

	<i>Ad</i>				0.84 (0.59-1.19)	0.33	0.87 (0.60-1.26)	0.46
<i>rs1676486</i> ^b								
	<i>Co</i>	<i>GG</i>	82 (78.09)	134 (73.22)	1.00		1.00	
		<i>GA</i>	20 (19.05)	49 (26.78)	0.67 (0.37-1.20)	0.02	0.59 (0.32-1.09)	0.03
		<i>AA</i>	3 (2.86)	0 (0)	Omitido		Omitido	
	<i>Do</i>	<i>GG</i>	82 (78.09)	134 (73.22)	1.00		1.00	
	<i>Do</i>	<i>GA/AA vs GG</i>	23 (21.91)	49 (26.78)	0.77 (0.44-1.35)	0.36	0.67 (0.37-1.2)	0.17
	<i>Re</i>	<i>AA vs GG/GA</i>	3 (2.86)	0 (0.00)	Omitido	0.01	Omitido	0.04
	<i>Ad</i>				0.91 (0.54-1.54)	0.72	0.79 (0.46-1.35)	0.39

Co modelo codominante

Do modelo dominante

Re modelo recesivo

Ad modelo aditivo

^a calculado con regresión logística en modelo ajustado por edad e Hipertensión Arterial Sistémica

^b el polimorfismo no se encuentra en EHW en el grupo control

Análisis de epistasis entre rs2167270 y rs2010963 con MDR

Posteriormente, se analizó la asociación de la interacción entre rs2167270 y rs2010963, con OA de rodilla en la muestra; solo analizamos estas variantes porque eran las únicas en EHW. El software MDR predijo el mejor modelo de interacción rs2167270/rs2010963, con una precisión de entrenamiento de validación cruzada de 0.57, precisión de prueba de 0.52, validación cruzada 10/10 y un OR (IC95%) de toda la muestra de 1.76 (1.08-2.87) ($p=0.02$) (tabla 6). Por otra parte, el modelo gráfico de tabla de contingencia muestra un sombreado con tendencia a la dispersión de las casillas de alto riesgo (figura 2). Además, en el dendograma se observa la unión entre las variables con una línea roja (epistasis sinérgica), mientras que el gráfico de Fruchterman-Rheingold muestra una GI de 0.36% y 0.53% de los efectos independientes de cada variante del modelo de interacción rs2167270/rs2010963, así como el 0.43% de GI aportada por la interacción para explicar el fenotipo de OA de rodilla (figura 3). Estos datos muestran que hay un efecto de epistasis sinérgica entre las variantes de *LEP* y *VEGF* que se asocia con OA de rodilla en nuestra muestra.

Tabla 6. Mejor modelo de interacción entre rs2167270 (*LEP*) y rs2010963 (*VEGF*) asociado con OA de rodilla en el análisis con MDR.

Modelo	Precisión de entrenamiento	Precisión de prueba	Consistencia VC	RM (IC95%)^a	p^a
rs2167270	0.54	0.52	9/10	1.49 (0.86-2.59)	0.15
rs2167270-rs2010963	0.57	0.52	10/10	1.76 (1.08-2.87)	0.02

VC Validación cruzada

Negritas valor estadísticamente significativo $p < 0.05$

^a valores de la muestra total

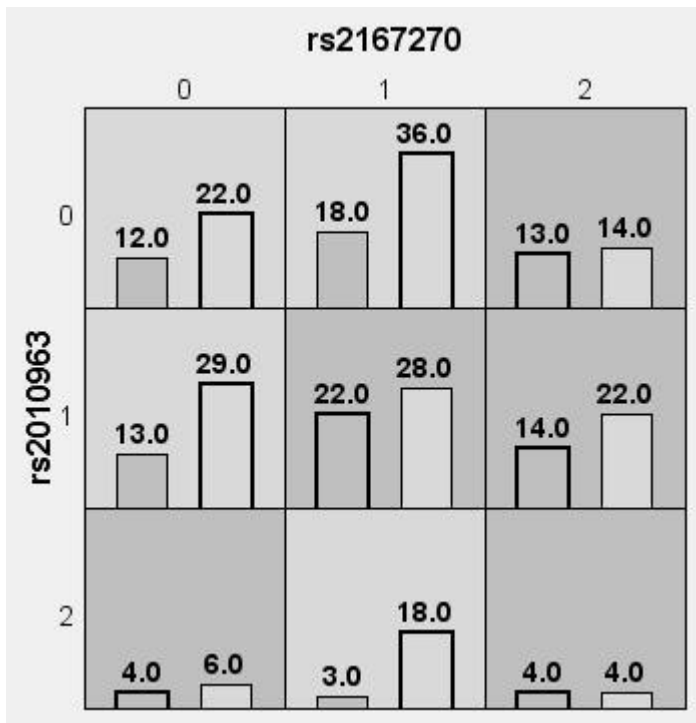


Figura 2. **Tabla de celdas de distribución de frecuencias genotípicas entre casos y controles de la muestra parcial, en el análisis con MDR.**

Los números 0, 1 y 2, se refieren al número de alelos de riesgo de cada polimorfismo, en este caso, para rs2167270 GG (0), AG (1), y AA (2); mientras que para rs2010963 TT (0), CT (1), y CC (2). En cada celda, la barra de la izquierda son los casos y la derecha controles; en su cúspide la frecuencia absoluta de los sujetos estudiados en cada combinación de genotipos. La coloración gris obscura de la celda simboliza una combinación de alto riesgo (cuando la frecuencia relativa, que no está mostrada, es mayor en los casos que en los controles), mientras que la gris claro representa bajo riesgo (la frecuencia relativa es mayor en los casos).

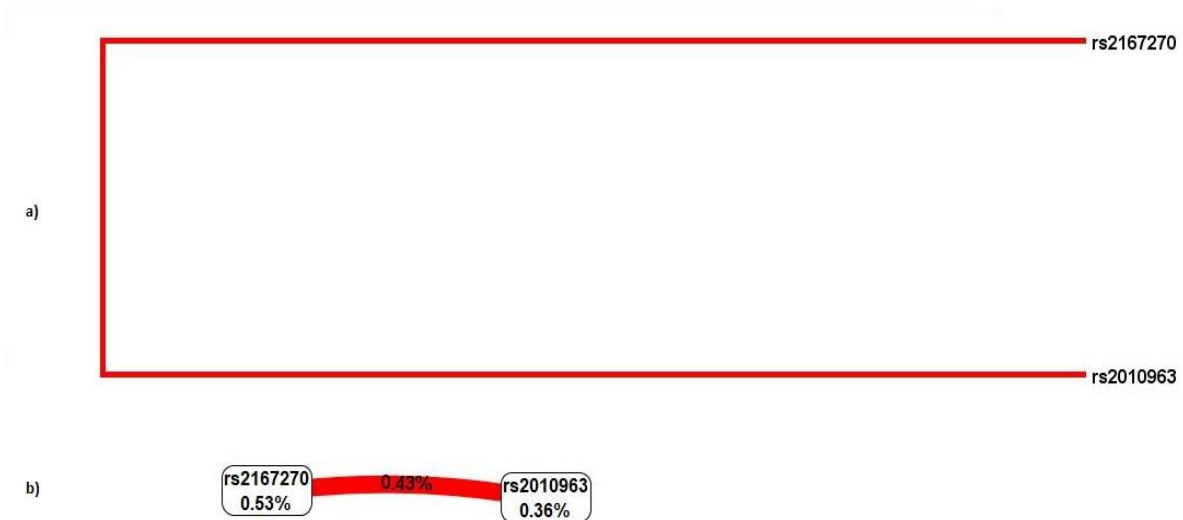


Figura 3. **Análisis gráfico del modelo de interacción rs2167270/rs2010963 con OA de rodilla.**

a) Dendrograma: las líneas unen a las variantes que están interactuando, su coloración representa la independencia de las variables asociadas en la interacción; la escala va desde el rojo, significando un alto efecto epistático, hasta el azul que representa gran redundancia de información. En este caso, podríamos interpretar una fuerte asociación de epistasis en el modelo. b) Esquema de Fruchterman-Reingold: Cada polimorfismo está incluido en un nodo donde se incluye el porcentaje de información que ayuda a explicar el fenotipo de OA de rodilla; además, están unidos por una línea sobre la que está representada la cantidad de información que aporta la interacción genética al fenotipo; por último, el color de la línea de interacción representa la ausencia de independencia, y su consistencia a través de las pruebas cruzadas, de tal forma que, la escala va desde el rojo (epistasis fuertemente sinérgica), hasta el azul (gran redundancia de información). En este caso el polimorfismo rs2167270 aporta 0.53% y rs2010963 aporta 0.36%, por sí solos; además, presentan un efecto de epistasis sinérgica que aporta una GI de 0.43%.

Resultados de la muestra total

Análisis de asociación de rs1676486 (COL11A1), rs3753841 (COL11A1), rs1146031 (ACVR1) y rs2227861 (ACVR1) rs25648 (VEGF) con OA de rodilla

En la muestra total del estudio se analizaron los datos de un total de 879 sujetos, representados por 380 casos con OA de rodilla (38.7% leves, 39.7% moderados, y 21.6% severos) y 499 controles. Los casos fueron significativamente de mayores en edad (64.87 ± 11.06 vs 58.29 ± 11.32 años; $p < 0.01$) y presentaron un ligero incremento en el IMC (25.26 ± 2.37 vs 29.4 ± 2.34 kg/m²) estadísticamente significativo ($p = 0.04$). También se observó que el 75.8% de los casos y el 72.1% de los controles son de sexo femenino, pero sus diferencias no son significativas estadísticamente ($p = 0.22$). No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de tabaquismo ($p = 0.53$) y alcoholismo ($p = 0.79$), aunque se observaron ligeramente incrementadas en el grupo control (25.2% vs 27.2%, y 29.4% vs 30.3%, respectivamente). Como era de esperarse, se observó una mayor frecuencia en el desempeño de actividades laborales asociadas con el daño articular en los pacientes con OA de rodilla comparado con los controles (24.3% vs 22.2%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.47$). Sin embargo, las actividades deportivas asociadas con el desarrollo de OA, además de no estar asociadas significativamente en la muestra de estudio ($p = 0.18$), se encontraron más frecuentemente practicadas por los pacientes del grupo control (14.5% vs 17.8%). Por otra parte, los diagnósticos de DMT2 y HAS fueron significativamente más prevalentes en el grupo de casos (22.9% vs 15.8%, $p < 0.01$; 38.2% vs 25.8%, $p < 0.01$; respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de cardiopatía ($p = 0.62$) o cáncer ($p = 0.16$) (tabla 7). Las variables edad, IMC, DMT2 y HAS, presentaron diferencias significativas en nuestra muestra, por lo que se usaron para ajustar el análisis multivariado en los modelos de herencia de análisis posteriores.

Tabla 7. Características demográficas de la muestra total estudiada

Variable	Casos (n=380)	Controles (n=499)	p
<i>Edad (años, media±DE)</i>	63.87±11.06	58.29±11.32	<0.01^a
<i>IMC (kg/m², media±DE)</i>	25.26±2.37	24.94±2.34	0.04^a
<i>Sexo (n, %)</i>	288 (75.79)	360 (72.14)	0.22
<i>Tabaquismo (n, %)</i>	90 (25.21)	122 (27.17)	0.53
<i>Alcoholismo (n, %)</i>	105 (29.41)	136 (30.29)	0.79
<i>Actividad laboral de riesgo (n, %)</i>	92 (24.34)	111 (22.24)	0.47
<i>Actividad deportiva de riesgo (n, %)</i>	55 (14.47)	89 (17.84)	0.18
<i>Enfermedad concomitante</i>			
<i>Diabetes mellitus tipo 2 (n, %)</i>	87 (22.89)	79 (15.83)	<0.01
<i>HAS (n, %)</i>	143 (38.24)	128 (25.81)	<0.01
<i>Cardiopatía (n, %)</i>	26 (6.84)	30 (6.01)	0.62
<i>Cáncer (n, %)</i>	16 (4.21)	32 (6.41)	0.16
<i>Clasificación radiológica</i>			
<i>G0 (n, %)</i>		324 (64.93)	
<i>G1 (n, %)</i>		175 (35.07)	
<i>G2 (n, %)</i>	147 (38.68)		
<i>G3 (n, %)</i>	151 (39.74)		
<i>G4 (n, %)</i>	82 (21.58)		

n Tamaño de la muestra

IMC Índice de Masa Corporal

OA Osteoartritis

HAS Hipertensión Arterial Sistémica

Los valores en **negritas** son estadísticamente significativos (p<0.05)

^a Se usó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon debido a que no se presentó una normalidad de la curva el test Shapiro-Francia (datos no mostrados)

Las frecuencias alélicas de las variantes rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648 se encontraron en EHW en el grupo control de nuestro estudio ($p= 0.41$, $p= 0.84$, $p=0.77$ y $p= 0.40$, respectivamente); mientras que rs2227861 no se encontró en EHW ($p < 0.01$) en nuestra muestra, debido a esto, no se consideraron válidos los resultados de los análisis posteriores referentes a esta variante. Aunque no se encontró ninguna diferencia significativa, las frecuencias alélicas de *A* de rs1676486, *G* de rs3753841 y *G* de rs2227861 se encontraron ligeramente incrementadas entre los casos; mientras que *C* de rs1146031 y *T* de rs25648 lo estaban en el grupo control (tabla 8). En cuanto al análisis de los modelos de herencia, tampoco se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas en los modelos codominante, dominante, recesivo, o aditivo, entre las variantes estudiadas de forma individual con OA de rodilla. Sin embargo, la mayoría de los genotipos de rs1676486, rs3753841 y rs2227861, mantuvieron una razón de momios (RM) ligeramente mayor a 1 en casi todos los modelos estudiados, mientras que rs1146031 y rs25648 se mantuvieron debajo de la unidad ($p > 0.05$, en todos los modelos) (tabla 9).

Tabla 8. Distribución de las frecuencias alélicas los polimorfismos rs1676486 (COL11A1), rs3753841 (COL11A1), rs1146031 (ACVR1) rs2227861 (ACVR1), y rs25648 (VEGF) con OA de rodilla

SNV	Alelo	Casos (n=371)	Controles (n=490)	RM (IC95%)	p	pHWE
<i>rs1676486</i>	G	635 (85.58)	848 (86.35)	1		0.41
	A	107 (14.42)	134 (13.65)	1.06 (0.80-1.42)	0.65	
<i>rs3753841</i>		n=376	n=491			
	A	578 (76.86)	757 (77.09)	1		0.84
<i>rs1146031</i>		n=379	n=493			
	T	750 (98.94)	973 (98.68)	1		0.77
<i>rs2227861</i>		n=376	n=493			
	C	8 (1.06)	13 (1.32)	0.80 (0.28-2.09)	0.62	
<i>rs25648</i>		n=378	n=494			
	A	646 (85.90)	855 (86.71)	1		<0.00 ^a
<i>rs25648</i>	G	106 (14.10)	131 (13.29)	1.07 (0.80-1.42)	0.63	
	C	635 (83.99)	825 (83.50)	1		0.40
<i>rs25648</i>	T	121 (16.01)	163 (16.50)	0.96 (0.73-1.26)	0.79	

SNV variante de un solo nucleótido

pEHW valor de p de equilibrio de Hardy-Weinberg

^a el polimorfismo no se encuentra en EHW en el grupo control

Tabla 9. Asociación de los genotipos de rs1676486 (COL11A1), rs3753841 (COL11A1), rs1146031 (ACVR1) rs2227861 (ACVR1), y rs25648 (VEGF) con OA de rodilla en la población Mexicana

SNV	Modelo	Genotipo	Casos (n=371)	Controles (n=490)	RM (IC95%)	p	RM (IC95%) ^a	p ^a
<i>rs1676486</i>								
	Co	GG	271 (73.05)	364 (74.13)	1		1	
		GA	93 (25.07)	120 (24.44)	1.04 (0.76-1.42)	0.80	1.03 (0.75-1.43)	0.84
		AA	7 (1.89)	7 (1.43)	1.34 (0.46-3.87)	0.59	1.11 (0.36-3.51)	0.85
	Do	GA/AA vs GG	100 (26.95)	127 (25.87)	1.06 (0.77-1.45)	0.72	1.04 (0.76-1.43)	0.81
	Re	AA vs GG/GA	7 (1.89)	7 (1.43)	1.33 (0.39-4.48)	0.59	1.11 (0.35-3.47)	0.86
	Ad				1.06 (0.81-1.41)	0.64	1.04 (0.78-1.39)	0.79
<i>rs3753841</i>								
	Co	AA	227 (60.37)	291 (59.27)	1		1	
		GA	124 (32.98)	175 (35.64)	0.91 (0.68-1.21)	0.51	0.88 (0.65-1.19)	0.42
		GG	25 (6.65)	25 (5.09)	1.28 (0.72-2.29)	0.40	1.21 (0.66-2.21)	0.55
	Do	GA/GG vs AA	149 (39.63)	200 (40.73)	0.96 (0.72-1.27)	0.74	0.92 (0.69-1.23)	0.59
	Re	GG vs AA/GA	25 (6.65)	25 (5.09)	1.33 (0.72-2.45)	0.32	1.26 (0.69-2.29)	0.44
	Ad				1.01 (0.81-1.26)	0.91	0.98 (0.78-1.24)	0.89
<i>rs1146031</i>								
	Co	TT	371 (97.89)	480 (97.36)	1		1	
		TC	8 (2.11)	13 (2.64)	0.80 (0.33-1.94)	0.62	0.82 (0.33-2.07)	0.68
		CC	0	0	NA		NA	
	Do	TT/CC vs TT	8 (2.11)	13 (2.64)	0.80 (0.28-2.10)	0.62	0.82 (0.33-2.07)	0.68
	Re	CC vs TT/TC	0	0	NA		NA	
	Ad				0.80 (0.33-1.94)	0.62	0.82 (0.33-2.07)	0.68
<i>rs2227861</i>								
	Co	AA	270 (71.81)	362 (73.43)	1		1	
		GA	106 (28.19)	131 (26.57)	1.08 (0.80-1.47)	0.60	1.15 (0.84-1.57)	0.39
		GG	0	0	NA		NA	
	Do	GA/GG vs AA	106 (28.19)	131 (26.57)	1.08 (0.79-1.48)	0.60	1.15 (0.84-1.57)	0.39
	Re	GG vs AA/GA	0	0	NA		NA	

<i>rs25648</i>	Ad				1.08 (0.80-1.47)	0.60	1.15 (0.84-1.57)	0.39
	Co	CC	265 (70.11)	347 (70.24)	1		1	
		TC	105 (27.78)	131 (26.52)	1.04 (0.77-1.42)	0.75	1.03 (0.75-1.41)	0.84
		TT	8 (2.12)	16 (2.24)	0.65 (0.28-1.55)	0.34	0.69 (0.28-1.66)	0.40
	Do	TC/TT vs CC	113 (29.89)	147 (29.76)	1.01 (0.74-1.36)	0.96	1.00 (0.73-1.35)	0.97
	Re	TT vs CC/TC	8 (2.12)	16 (3.24)	0.64 (0.24-1.62)	0.31	0,68 (0.28-1.64)	0.39
	Ad				0.96 (0.75-1.25)	0.78	0.96 (0.74-1.25)	0.76

EHW Equilibrio de Hardy-Weinberg

Co modelo codominante

Do modelo dominante

Re modelo recesivo

Ad modelo aditivo

^a Calculado por regresión logística en modelo ajustado por edad, índice de masa corporal, Diabetes mellitus tipo 2 e Hipertensión Arterial Sistémica

Posteriormente, se estratificó el grupo de casos en subfenotipos definidos por la severidad de OA de rodilla de acuerdo a la clasificación radiológica de KL, de tal manera que se comparó a los grupos, OA leve (KL2), moderada (KL3), y severa (KL4), contra el grupo control. En el análisis de las frecuencias alélicas de rs1676486, rs1146031, rs2227861 y rs25648, no se encontraron diferencias significativas entre los subfenotipos KL2, KL3, y KL4, y los controles ($p > 0.05$). Sin embargo, el alelo G de rs3753841 se asoció de forma significativa con un incremento en el riesgo en el subgrupo de pacientes KL3, con un RM (IC95%) 1.35 (1.0-1.83; $p = 0.04$) (tabla 10). Así mismo, el genotipo GA demostró disminuir el riesgo de forma significativa en pacientes del subgrupo KL2 [RM (IC95%) 0.62 (0.41-0.96)]; y también se encontró un aumento significativo del riesgo en el subgrupo KL3 [RM (IC95%) 1.35 (1.01-1.82)] en el análisis del modelo aditivo. Además, se encontró una tendencia no significativa estadísticamente a incrementar el riesgo del subgrupo KL3 en los modelos codominante [GA vs AA, RM (IC95%) 1.99 (0.97-4.07)], dominante [GA+GG vs AA, RM (IC95%) 1.37 (0.94-2.03)], y recesivo [GG vs AA+GA, RM (IC95%) 1.79 (0.82-3.76)]. Sin embargo, solo la asociación entre el genotipo GA de rs3753841 se mantuvo asociada significativamente a KL3 después del análisis multivariado, ajustado por las variables edad, IMC, HAS y DMT2 [RM ajustado (IC95%) 0.64 (0.42-0.98), ($p=0.04$)]. Ninguno de los genotipos de las otras variantes mostró asociación significativa de forma individual con los distintos subgrupos de OA de rodilla, en alguno de los modelos de herencia analizados (tabla 11).

Tabla 10. Distribución de las frecuencias alélicas de rs1676486 (COL11A1), rs3753841 (COL11A1), rs1146031 (ACVR1), rs2227861 (ACVR1) y rs25648 (ACVR1) en los subgrupos, OA de rodilla leve, moderada y severa

SNV	Alelo	KL 2 (n=146)	Controles (n=491)	RM (IC95%)	p	KL 3 (n=146)	RM (IC95%)	p	KL 4 (n=79)	RM (95%IC)	p
rs1676486	G	253 (86.64)	848 (86.35)	1		242 (82.88)	1		140 (88.61)	1	
	A	39 (13.36)	134 (13.65)	0.97 (0.65-1.45)	1.0	50 (17.12)	1.31 (0.90-1.89)	0.14	18 (11.39)	0.81 (0.45-1.39)	0.44
rs3753841	A	233 (79.79)	757 (77.09)	1		211 (71.28)	1		134 (81.71)	1	
	G	59 (20.21)	225 (22.91)	0.85 (0.61-1.18)	0.33	85 (28.72)	1.35 (1.0-1.83)	0.04	30 (18.29)	0.75 (0.48-1.16)	0.75
rs1146031	T	289 (98.30)	973 (98.68)	1		298 (99.33)	1		163 (99.39)	1	
	C	5 (1.70)	13 (1.32)	1.29 (0.36-3.91)	0.62	2 (0.67)	0.50 (0.05-2.24)	0.36	1 (0.61)	0.46 (0.01-3.10)	0.44
rs2227861 ^a	A	252 (86.30)	855 (86.71)	1		252 (85.14)	1		142 (86.59)	1	
	G	40 (13.70)	131 (13.29)	1.03 (0.69-1.53)	0.85	44 (14.86)	1.14 (0.77-1.67)	0.49	22 (13.41)	1.01 (0.59-1.66)	0.96
rs25648	C	252 (85.71)	825 (83.50)	1		248 (82.67)	1		135 (83.33)	1	
	T	42 (14.29)	163 (16.50)	0.84 (0.57-1.23)	0.36	52 (17.33)	1.06 (0.74-1.51)	0.73	27 (16.67)	1.01 (0.62-1.60)	0.96

SNV variante de un solo nucleótido

KL Grado radiológico de Kellgren-Lawrence, 2=leve, 3=moderado, 4=severo

p valor de probabilidad

Negritas valor estadísticamente significativo p< 0.05

^a el polimorfismo no se encuentra en EHW en el grupo control

Tabla 11. Asociación de los genotipos de rs1676486 (*COL11A1*), rs3753841 (*COL11A1*), rs1146031 (*ACVR1*), rs2227861 (*ACVR1*) y rs25648 (*ACVR1*) con OA radiológica leve, moderada y severa

SNV	Modelo	Genotipo	KL 2 (n=146)	Controles (n=491)	RM (IC95%) ^a	p ^a	KL 3 (n=146)	RM (IC95%) ^a	p ^a	KL 4 (n=79)	RM (IC95%) ^a	p ^a
rs1676486	Co	GG	110 (75.34)	364 (74.13)	1		100 (68.49)	1		61 (77.22)	1	
		GA	33 (22.60)	120 (24.44)	0.93 (0.59-1.45)	0.74	42 (28.77)	1.20 (0.78-1.85)	0.41	18 (22.78)	0.86 (0.47-1.56)	0.62
		AA	3 (2.05)	7 (1.43)	1.11 (0.27-4.55)	0.89	4 (2.74)	2.05 (0.54-7.81)	0.30	0	Omitido	
	Do	GA/AA vs GG	36 (24.66)	127 (25.87)	0.94 (0.61-1.45)	0.77	46 (31.51)	1.24 (0.82-1.89)	0.31	18 (22.78)	0.79 (0.43-1.44)	0.44
	Re	AA vs GG/GA	3 (2.05)	7 (1.43)	1.13 (0.28-4.60)	0.87	4 (2.74)	1.94 (0.51-7.37)	0.33	0	Omitido	
	Ad				0.96 (0.65-1.42)	0.83		1.26 (0.86-1.84)	0.24		0.74 (0.42-1.31)	0.30
rs3753841	Co	AA	98 (67.12)	291 (59.27)	1		76 (51.35)	1		53 (64.63)	1	
		GA	37 (25.34)	175 (35.64)	0.64 (0.42-0.98)	0.04	59 (39.86)	1.21 (0.81-1.82)	0.35	28 (34.15)	0.81 (0.47-1.38)	0.43
		GG	11 (7.53)	25 (5.09)	1.24 (0.58-2.66)	0.58	13 (8.78)	1.97 (0.93-4.16)	0.08	1 (1.22)	0.16 (0.02-1.27)	0.08
	Do	GA/GG vs AA	48 (32.88)	200 (40.73)	0.72 (0.48-1.07)	0.10	72 (48.65)	1.31 (0.89-1.92)	0.17	29 (35.37)	0.71 (0.42-1.20)	0.20
	Re	GG vs AA/GA	11 (7.53)	25 (5.09)	1.43 (0.68-3.04)	0.35	13 (8.78)	1.82 (0.88-3.78)	0.11	1 (1.22)	0.17 (0.02-1.36)	0.10
	Ad				0.85 (0.62-1.18)	0.33		1.31 (0.97-1.78)	0.08		0.67 (0.42-1.05)	0.08
rs1146031	Co	TT	142 (96.60)	480 (97.36)	1		148 (98.67)	1		81 (98.78)	1	
		TC	5 (3.40)	13 (2.64)	1.34 (0.46-3.91)	0.60	2 (1.33)	0.54 (0.12-2.50)	0.43	1 (1.22)	0.68 (0.08-5.56)	0.72
		CC	0	0	Omitido		0	Omitido		0	Omitido	
	Do	TC/CC vs TT	5 (3.40)	13 (2.64)	1.34 (0.46-3.91)	0.60	2 (1.33)	0.54 (0.12-2.50)	0.43	1 (1.22)	0.68 (0.08-5.56)	0.72
	Re	CC vs TT/TC	0	0	Omitido		0	Omitido		0	Omitido	
	Ad				1.34 (0.46-3.91)	0.60		0.54 (0.12-2.50)	0.43		0.68 (0.08-5.56)	0.72

rs2227861	Co	AA	106 (72.60)	362 (73.43)	1	104 (70.27)	1	60 (73.17)	1			
		GA	40 (27.40)	131 (26.57)	1.10 (0.72-1.68)	0.67	44 (29.73)	1.25 (0.82-1.90)	0.30	22 (26.83)	1.07 (0.61-1.88)	0.82
		GG	0	0	Omitido		0	Omitido		0	Omitido	
	Do	GA/GG vs AA	40 (27.40)	131 (26.57)	1.10 (0.72-1.68)	0.67	44 (29.73)	1.25 (0.82-1.90)	0.30	22 (26.83)	1.07 (0.61-1.88)	0.82
	Re	GG vs AA/GA	0	0	Omitido		0	Omitido		0	Omitido	
	Ad				1.10 (0.72-1.68)	0.67		1.25 (0.82-1.90)	0.30		1.07 (0.61-1.88)	0.82
rs25648	Co	CC	108 (73.47)	347 (70.24)	1	100 (66.67)	1	57 (70.37)	1			
		TC	36 (24.49)	131 (26.52)	0.92 (0.59-1.14)	0.69	48 (32.00)	1.26 (0.83-1.90)	0.28	21 (25.93)	0.82 (0.46-1.48)	0.52
		TT	3 (2.04)	16 (3.24)	0.63 (0.18-2.23)	0.47	2 (1.33)	0.46 (0.10-2.06)	0.31	3 (3.70)	1.16 (0.30-4.41)	0.83
	Do	TC/TT vs CC	39 (26.53)	147 (29.76)	0.88 (0.58-1.35)	0.57	50 (33.33)	1.17 (0.78-1.76)	0.45	24 (29.63)	0.86 (0.49-1.50)	0.59
	Re	TT vs CC/TC	3 (2.04)	16 (3.24)	0.64 (0.18-2.27)	0.49	2 (1.33)	0.43 (0.10-1.92)	0.27	3 (3.70)	1.22 (0.33-4.61)	0.77
	Ad				0.87 (0.60-1.26)	0.47		1.06 (0.74-1.51)	0.76		0.92 (0.57-1.48)	0.72

SNV variante de un solo nucleótido

KL Grado radiológico de Kellgren-Lawrence, 2=leve, 3=moderado, 4=severo

Co Codominante

Do Modelo dominante

Re Modelo recesivo

Ad Modelo aditivo

Negritas valor estadísticamente significativo $p < 0.05$

^a Calculado por regresión logística en modelo ajustado por edad, índice de masa corporal, Diabetes mellitus tipo 2 e Hipertensión Arterial Sistémica

Análisis de asociación haplotipos de las variantes de COL11A1 con Haploview

Con el software Haploview se analizó la probabilidad de que las variantes del gen *COL11A1* se encontrasen en desequilibrio de ligamiento y formen haplotipos. En los resultados del análisis se observó que entre rs1676486 y rs3753841 existe una gran cercanía en el espacio genómico ($D' = 0.96$), además de que presentan una gran probabilidad de segregar juntos (LOD score= 114.9); esto significa que ambas variantes se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Considerando esta última característica se formaron bloques de haplotipos, AG [RM (IC95%) 1.11 (0.79-1.41)] y GG [RM (IC95%) 0.96 (0.68-1.35)], y se analizó si existía alguna diferencia en sus frecuencias entre los casos y los controles, pero ninguno de ellos mostró una asociación significativa con OA de rodilla ($p > 0.05$) (tabla 12) (figura 4). Esto significa que rs1676486 y rs3753841 están lo suficientemente cerca en el mapa genómico para que aumente considerablemente la probabilidad de que segreguen juntos y formen haplotipos, pero estos últimos no se encuentran asociados con OA de rodilla en nuestra población.

Tabla 12. Frecuencia de los haplotipos formados por rs1676486 y rs3753841 (COL11A1) y su asociación con OA de rodilla en la población mexicana

Bloque	Frecuencia	Casos	Controles	RM (IC95%)	p
GA	0.766	577 (0.764)	763 (0.769)	1	0.803
AG	0.136	106 (0.140)	132 (0.133)	1.106 (0.796-1.414)	0.6458
GG	0.094	69 (0.092)	95 (0.095)	0.960 (0.681-1.350)	0.8017

GA representa el haplotipo formado por las variantes más frecuentes contra el que se compararon los bloques AG y GG

Frecuencia de los haplotipos en la muestra total

p valor de probabilidad

Negritas valor estadísticamente significativo $p < 0.05$



Figura 4. **Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de COL11A1.**

D' es una medida que representa la cercanía entre los *loci* de las SNV (entre más cercano a 1 mayor cercanía entre las variantes); LOD o LOD score, es la medida de la probabilidad de que ambos SNV se segreguen juntos (podemos considerar ligamiento entre las SNV cuando LOD sea mayor a 3); r^2 representa la correlación estadística entre los polimorfismos (entre más cercano a 1 es más confiable el parámetro)

Análisis de epistasis entre rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648 con MDR

En búsqueda de evidencia de epistasis asociada a OA de rodilla, se analizó la muestra con el método MDR; en este análisis solo incluimos las variantes encontradas en EHW, es decir, rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648. El software MDR predijo un mejor modelo de interacción, rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648, con una precisión de entrenamiento de validación cruzada de 0.53, precisión de prueba de 0.49, y validación cruzada 10/10; y un RM (IC95%) de toda la muestra de 1.75 (1.07-2.87) ($p= 0.02$) (tabla 13). Por otra parte, las tablas en la figura muestran la distribución de los genotipos de rs3753841 en relación a la cantidad de alelos de riesgo en los genotipos de rs1676486, rs1146031 y rs25648, de tal manera que se pueden observar las combinaciones de alto riesgo en las casillas gris oscuro y las de bajo riesgo en la gris claro (figura 5). En el dendograma (figura 6a), se observa la unión de las variantes de *COL11A1* (rs1676486 y rs3753841) por líneas azules (efecto redundante), esto coincide con el hecho de que estas variantes se encuentran en desequilibrio de ligamiento y, por lo tanto, la presencia de una depende de la otra. Por otra parte, se observa que rs1146031 (*ACVR1*) y rs25648 (*VEGF*) se encuentran unidos por una línea color amarillo ocre, esto simboliza que los efectos de las variantes son aditivos, es decir, presentan independencia. El gráfico de Fruchterman-Rheingold nos muestra que las variantes estudiadas por si solas aportan cierta información al fenotipo (rs1676486 0.02%, rs3753841 0.15%, rs1146031 0.02%, y rs25648 0.07%); así mismo, se observa que las interacciones rs1676486/rs1146031 y rs1146031/rs25648, presentan efectos independientes o redundantes (GI cerca de 0 o menor, y línea de interacción amarilla) (figura 6b). Estos datos muestran que hay un efecto de interacción redundante entre las variantes de *COL11A1* (rs1676486 y rs3753841) y efectos independientes con tendencia a la redundancia entre las variantes rs1146031 con rs1676486 y rs25648.

Tabla 13. Mejor modelo de interacción entre rs1676486, rs3753841, rs1146031 y rs25648 en MDR

Modelo de interacción	Precisión de entrenamiento	Precisión de prueba	Consistencia VC	RM (IC95%)	p
rs3753841	0.52	0.50	10/10	1.14 (0.85-1.52)	0.37
rs3753841-rs25648	0.52	0.49	9/10	1.21 (0.91-1.61)	0.20
rs1676486-rs3753841-rs25648	0.53	0.48	10/10	1.30 (0.96-1.76)	0.09
rs1676486-rs3753841-rs1146031-rs25648	0.53	0.49	10/10	1.35 (1.00-1.84)	0.05

VC Validación cruzada

RM razón de momios de la asociación del modelo de interacción en la muestra total

p valor de probabilidad de la asociación del modelo de interacción en la muestra total

Negritas valor estadísticamente significativo $p < 0.05$

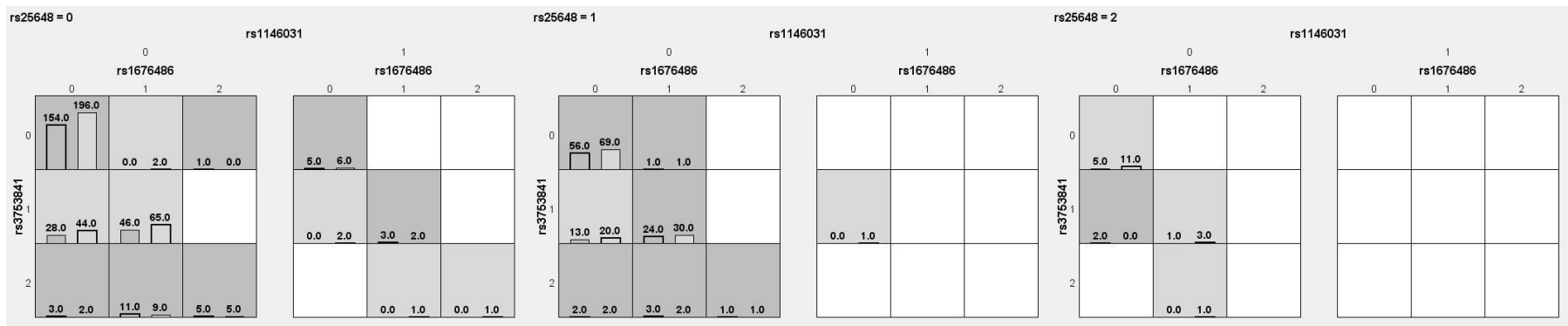


Figura 5. **Tabla de celdas de distribución de frecuencias genotípicas entre casos y controles de la muestra total, en el análisis con MDR.**

Los números 0, 1 y 2, se refieren al número de alelos de riesgo de cada polimorfismo, en este caso, para rs25648 CC (0), TC (1), y TT (2); rs1146031 TT (0), CT (1), y CC (2); rs1676486 GG (0), AG (1), y AA (2); y rs3753841 AA (0), GA (1), y GG (2). En cada celda, la barra de la izquierda son los casos y la derecha controles; en su cúspide la frecuencia absoluta de los sujetos estudiados en cada combinación de genotipos. La coloración gris oscura de la celda simboliza una combinación de alto riesgo (cuando la frecuencia relativa, que no está mostrada, es mayor en los casos que en los controles), mientras que la gris claro representa bajo riesgo (la frecuencia relativa es mayor en los casos).

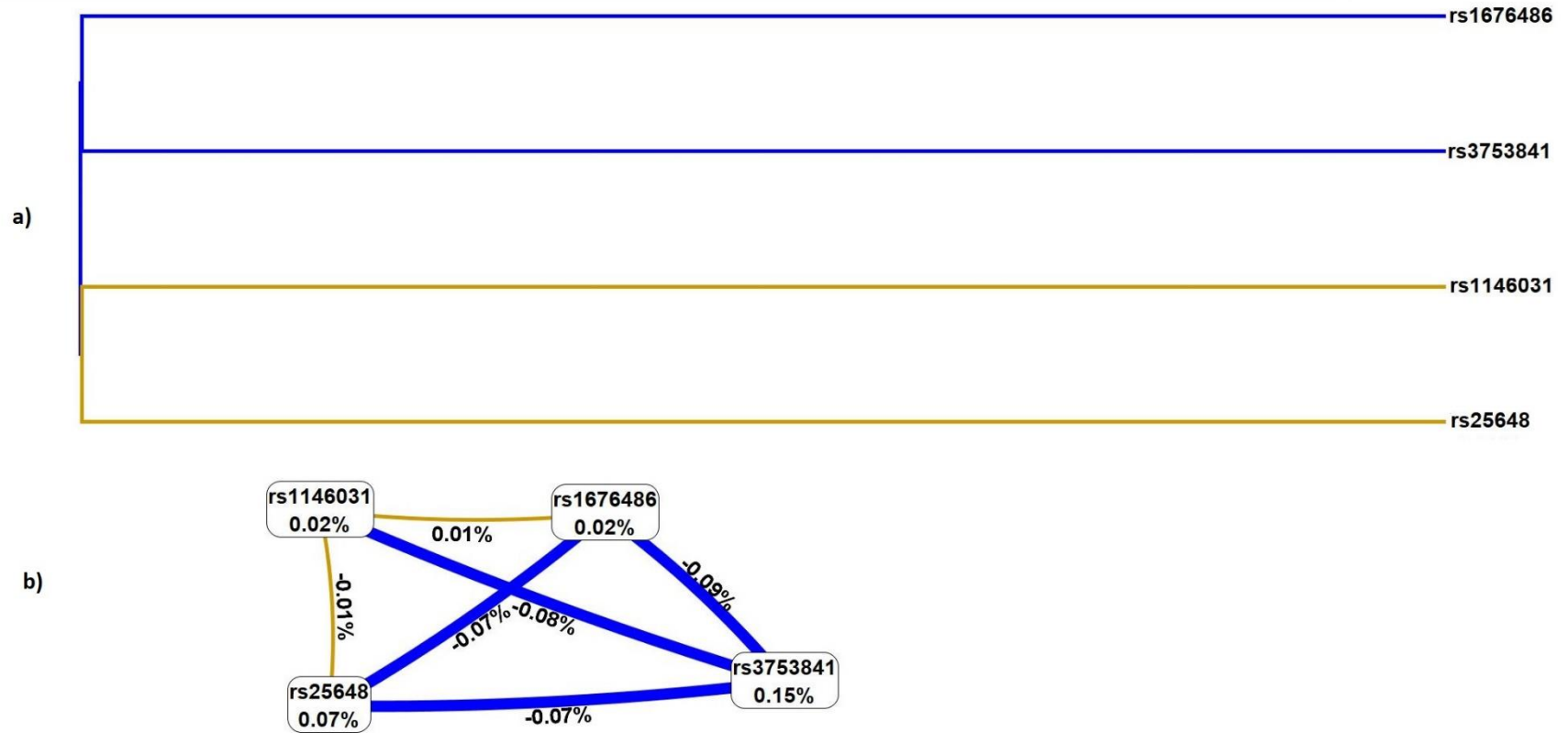


Figura 6. **Análisis gráfico del modelo de interacción rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648 con OA de rodilla.**

a) Dendrograma: las líneas unen a las variantes que están interactuando, su coloración representa la independencia de las variables asociadas en la interacción; la escala va de rojo, que significa un alto efecto epistático, seguido por naranja, ocre, verde, hasta el azul que representa gran redundancia de información. En este caso, el color ocre significa un posible efecto independiente entre rs1146031 con rs1676486 y rs25648, mientras que el color azul significa un efecto redundante, que coincide con el hecho de que rs3753841 y rs1676486 se encuentran en desequilibrio de ligamiento, por lo que segregan juntos y forman haplotipos. b) Esquema de Fruchterman-Rheingold: la variante rs1676486 aporta por sí sola una ganancia

de información de 0.02%, rs3753841 0.15%, rs1146031 0.02%, y rs25648 0.07%; también se observa que la interacción rs1676486/rs1146031 tienen efectos independientes (líneas color ocre) con una pequeña GI (0.01); mientras que la interacción rs1146031/rs25648 aporta -0.01% de GI al fenotipo (efectos independientes con tendencia a la redundancia); el resto de las interacciones génicas son redundantes en cuanto a la información aportada al fenotipo (líneas azules con GI negativa).

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar si rs2167270 (*LEP*), rs2010963 (*VEGF*), rs25648 (*VEGF*), rs1676486 (*COL11A1*), rs3753841 (*COL11A1*), rs1146031 (*ACVR1*) y rs2227861 (*ACVR1*), y las interacciones entre estas variantes, están asociados y tienen un efecto epistático asociado con el fenotipo de OA de rodilla en la población mexicana. Se encontró evidencia relevante para la hipótesis de estudio en 2 momentos. Primero, en una muestra parcial donde no se encontró evidencia de asociación individual de las variantes analizadas, pero sí un efecto sinérgico de epistasis entre variantes de *LEP* y *VEGF*. Después, en la muestra total, se observó asociación individual de rs3753841 con OA de rodilla grados leve y moderado; así como un modelo de interacción genética (con efectos redundantes e independientes) que involucra variantes de los genes *COL11A1*, *ACVR1* y *VEGF*.

Muestra parcial

No se encontró asociación individual entre las variantes de LEP y VEGF con OA de rodilla

En la primera parte del estudio se incluyó la información de 294 sujetos de estudio, 107 casos y 187 controles. En el análisis genético se observó que las variantes de *LEP*, rs2167270, y *VEGF*, rs2010963, no se asocian de forma individual con el desarrollo de OA en la muestra; aunque rs2167270 mostró una tendencia a incrementar el riesgo de OA [RM (IC95%) 1.23 (0.87-1.76)], mientras que rs2010963 tiende a disminuirlo [RM (IC95%) 0.82 (0.57-1.21)]. Como se sabe, el gen *LEP* participa en diversas vías de señalización, y se le conoce principalmente por su papel en la regulación del equilibrio energético y, además, por su actividad proinflamatoria, entre otras funciones (Motyl and Rosen, 2012; Park and Ahima, 2014; Scotece *et al.*, 2014; Khazaei and Tahergorabi, 2015). También se ha reportado un incremento en los niveles de leptina en plasma y líquido sinovial en pacientes con OA (Steppan *et al.*, 2000; Boer *et al.*, 2012). Además, favorece el incremento en la expresión de interleucinas, MMPs y otros factores catabólicos que interfieren con el metabolismo articular, favorecen la inflamación de la capsula sinovial, inhiben la síntesis de moléculas de la MEC

cartilaginosa y favorecen el desarrollo de OA (Yan *et al.*, 2018). Por su parte, rs2167270 se relaciona con los niveles circulantes de leptina y explica hasta el 10% de la variación de los niveles en plasma (Dasgupta *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2020). También se ha observado que el genotipo AA incrementa la metilación del gen *LEP*, afectando su expresión en tejido placentario y cordón umbilical (Lesseur *et al.*, 2013; Daniels *et al.*, 2020). Aunque existen reportes de otras variantes de *LEP* asociadas al desarrollo de OA de rodilla (Qin *et al.*, 2010), rs2167270 solo ha sido analizado en un estudio de OA de mano donde no se encontró asociación (Hämäläinen *et al.*, 2018). Aunque es una variante funcional, nuestro estudio coincide con la evidencia disponible en que rs2167270 no se encuentra asociado de manera individual a OA de rodilla.

A su vez, el gen *VEGF*, es el principal regulador de la angiogénesis en el organismo. Este mecanismo juega un papel primordial en el fenómeno de osificación endocondral, un mecanismo mediante el cual una placa de cartílago hialino es invadida por vasos sanguíneos que provocan que se diferencie en una placa ósea (Prein and Beier, 2019). La similitud de la OE con OA es importante, ya que en ambos procesos se encuentran involucradas la hipertrofia de los condrocitos, apoptosis, invasión vascular, engrosamiento del cartílago calcificado y adelgazamiento del cartílago superficial (Xiao and Lin, 2016). Esto ha llevado a demostrar que *VEGF* participa en el daño articular a través de su actividad desencadenante de angiogénesis con su interacción con la vía de señalización HIF1/VEGF/NOTCH1, provocando invasión vascular del CA y favoreciendo la formación de osteofitos en la mandíbula de rata con OA (Chen *et al.*, 2019). Además, VEGF ha demostrado ser un buen biomarcador en el grado de severidad de OA en líquido sinovial (Murata, Yudoh and Masuko, 2008; Duan *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2016). Sin embargo, la variante rs2010963 no se encontró asociada con OA de rodilla en pacientes mexicanos en el único reporte encontrado en la literatura (Sánchez-Enríquez *et al.*, 2008), lo que coincide con los resultados de este estudio.

Las variantes rs2167270 (LEP) y rs2010963 (VEGF) presentan epistasis que se asocia al desarrollo de OA de rodilla

El análisis con MDR en la muestra parcial mostró evidencia de efecto de epistasis sinérgica entre las variantes de *LEP* y *VEGF*, dentro del modelo rs2167270/rs2010963, con efecto sobre OA de rodilla. Se observó una precisión de entrenamiento de 0.57, precisión de prueba 0.52 y una consistencia de validación cruzada de 10/10; con una ganancia de información de 0.43% asociada a OA de rodilla. Si bien esta asociación no se ha reportado previamente con OA, existe evidencia de que las vías moleculares en las que estos genes participan se sobrelapan, y sus niveles de expresión se relacionan entre sí en la angiogénesis y otros procesos (Khazaei and Tahergorabi, 2015). En ensayos in vivo y modelos in vitro se ha observado que leptina induce la angiogénesis y la proliferación de la estructura de los capilares de forma similar a VEGF (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998; Artwohl *et al.*, 2002). También los tejidos en reparación por quemadura en rata mostraron un incremento en la vascularización al ser tratados con leptina recombinante (Liapakis *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que leptina favorece la proliferación endotelial y la permeabilidad vascular mediante un incremento en VEGF dependiente de dosis (Cao *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001). De forma interesante, el modelo de ratón deficiente de receptor de leptina (*Lepr^{db}*) exhibe una falla en la angiogénesis durante el desarrollo normal de la maduración de los miocitos esqueléticos, que corresponde con una incapacidad para incrementar el mRNA de VEGF y los niveles de proteína; también se observó que el tratamiento con leptina recombinante incrementa los niveles de mRNA de VEGF en miocitos humanos (Nwadozi *et al.*, 2019). Así mismo, en el reporte de un estudio en niños de origen Chino con cardiopatía congénita cianótica y acianótica se observó una correlación positiva entre los niveles séricos de leptina y VEGF (Zhang *et al.*, 2009). La interacción entre *LEP* y *VEGF* juega un papel importante en la regulación del proceso de angiogénesis y nuestra evidencia estadística nos sugiere que el efecto de epistasis del modelo rs2167270/rs2010963 nos permite explicar una parte de los mecanismos mediante los cuales este fenómeno se relaciona con el fenotipo OA de rodilla.

Por otra parte, la interacción entre *LEP* y *VEGF* también se ha observado en otros procesos fisiológicos y patológicos. En un análisis de interacción de redes moleculares para investigar la evolución de los cambios en la expresión génica en el tejido intestinal de pacientes con enfermedad celiaca (EC) con datos del análisis de expresión génica ómnibus (GEO), se observó que *LEP* es un nodo central y *VEGF* un importante cuello de botella en cuanto a la comunicación de las vías moleculares involucradas con la patología. Además, sugieren que *LEP* presenta una interacción directa con *VEGF*, en la cual *VEGF* interactúa con el gen de la amino oxidasa que contiene cobre 3 (*AOC3*) y activa e incrementa la regulación de *LEP* (Rezaei-Tavirani, Rostami-Nejad and Montazar, 2019). También se realizó un perfil proteómico en pacientes con enfermedad de Alzheimer y diabetes mellitus, para identificar las coincidencias en las vías moleculares asociadas a ambas enfermedades, en el cual se observó que *LEP* y *VEGF* son nodos centrales que forman parte de una red de interacción diversa que coincide con la fisiopatología de ambas enfermedades (Gholizadeh *et al.*, 2020). En células de cáncer de pulmón se observó que el cultivo con *VEGF* recombinante induce la expresión de *LEP*, al participar como parte de las vías PI3K/AKT, RAS/ERK, y STAT3 (Frezza *et al.*, 2016). Además, la leptina favorece un estado proinflamatorio y proangiogénico en tejido sinovial de artritis reumatoide, asociado a la expresión de factores angiogénicos como *VEGF* (Sun *et al.*, 2017). Toda esta evidencia apoya de forma importante la factibilidad del efecto de epistasis entre las variantes de los genes *LEP* y *VEGF*, y su asociación con OA de rodilla reportado en este estudio.

Muestra total

La variante genética rs3753841 se encuentra asociada con OA de rodilla de acuerdo al grado de severidad en la escala radiológica de Kellgren y Lawrence

En la muestra total se estudiaron 371 casos de OA de rodilla y 490 controles sanos. Aunque no se encontró diferencia significativa en la distribución de frecuencias en las variantes genéticas estudiadas de forma individual entre los casos y controles de la muestra total, sí se observó una asociación significativa entre el alelo G y el genotipo GA de rs3753841 (*COL11A1*) como factor de

riesgo para desarrollar OA de rodilla moderada (KL3) [RM (IC95%) 1.35 (1.0-1.83)] y como factor protector de OA de rodilla leve [RM (IC95%) 0.64 (0.42-0.98)], respectivamente. Se sabe que el gen *COL11A1* codifica para la fibrilla COL11A1, quien junto con COL11A2 y COL2A1 forman un heterotrímero denominado colágena tipo II. La expresión de esta fibrilla se encuentra presente en el cartílago y participa de forma importante en el desarrollo osteoarticular (Brown *et al.*, 2011). En el cartílago, es una de las primeras proteínas expresadas por las células mesenquimatosas que se diferencian en condroblastos y también participa en la formación y ensamblado de las fibras de colágeno que permiten la mineralización de la placa de cartílago en la osificación endocondral (Xu *et al.*, 2008; Hafez *et al.*, 2015b). Por otra parte, existe evidencia de que las mutaciones en este gen provocan la degradación de la colágena tipo II en el tejido articular; además de ser la etiología de enfermedades hereditarias como los síndromes de Marshall y Stickler tipo 2, las cuales presentan un componente displásico importante en el tejido articular (Snead and Yates, 1999; Sakka *et al.*, 2015). Así mismo, existe evidencia de que las variantes genéticas de *COL11A1* se han asociado al desarrollo de OA en poblaciones europeas y asiáticas (Rodríguez-fontenla, Calaza, Evangelou, Ana M. Valdes, *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). La variante rs3753841 provoca un cambio de aminoácido Pro>Leu en la estructura primaria de la fibrilla COL11A1, aunque no se ha descrito en la literatura que presente un efecto en el ensamblado de la estructura secundaria y terciaria, o la función de la proteína, probablemente porque ambos aminoácidos sean del tipo no polar. Sin embargo, en dos grandes estudios en poblaciones caucásica europeas se observó, primero, asociación con OA de cadera pero no con OA de rodilla en un meta-análisis con pacientes de los biobancos de Reino Unido e Islandia, y posteriormente asociación con OA en relación con la forma ósea determinada por absorciometría de rayos X en un GWAS (Styrkarsdottir *et al.*, 2018; Styrkarsdottir, 2019). De forma interesante, en el estudio de otras enfermedades como GPAC, también se ha observado que la asociación de esta variante puede depender de la severidad del fenotipo o la población estudiada (Awadalla *et al.*, 2013; Nongpiur *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021). La evidencia disponible apoya nuestros resultados y demuestra que rs3753841 se encuentra asociado al grado de severidad radiográfica de OA de rodilla en la población mexicana.

Se encontró un modelo de interacción entre rs1146031 (ACVR1), rs25648 (VEGF), rs3753841 y rs1676486 (COL11A1) con efectos redundantes o independientes sobre OA de rodilla

En el análisis de interacción genética de la muestra total se encontró que el modelo rs1676486/rs3753841/rs1146031/rs25648 presenta efectos independientes y/o redundantes sobre el fenotipo de OA de rodilla con una precisión de entrenamiento de 0.53, precisión de prueba 0.49 y consistencia de validación cruzada 10/10; además de una GI del modelo de interacción entre -0.01 a 0.01% de las interacciones entre rs1146031 (*ACVR1*) con rs1676486 (*COL11A1*) y rs25648 (*VEGF*), respectivamente. El gen *ACVR1* codifica para un receptor tipo activina que participa en la vía BMP/TGFB desencadenando la cadena de fosforilación de mensajeros SMAD, después de ser activado por la unión de BMP (Frederick S. Kaplan, Pignolo and Shore, 2013). Previene la hipertrofia y proliferación condrocitaria, además de inhibir la degradación de MEC y estimular la producción de sus componentes a través de la activación del anabolismo celular (Nishida, Knudson and Knudson, 2004b; Chubinskaya, Hurtig and Rueger, 2007b; C. Baugé *et al.*, 2014). No es de nuestro conocimiento que exista evidencia en la literatura de la interacción entre estas variantes genéticas, aunque si se ha reportado interacción entre los genes *ACVR1* con *VEGF*, así como *VEGF* con *COL11A1*, en relación con otros procesos fisiológicos y patológicos.

En un estudio que investigó el efecto de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la señalización de BMP, se observó que el incremento en HDL estimula progresivamente la expresión de ALK1 y *ACVR1* en el endotelio aórtico humano, lo que se asocia con un incremento en los niveles de *VEGF* (Yao *et al.*, 2008). La hipótesis propuesta por los investigadores es que HDL y BMP4 estimulan a su receptor favoreciendo la disminución de los genes homeobox *MSX2* y el aumento de *DLX3/5*, estimulando la expresión del gen *ACVR1*. De esta manera el receptor *ACVR1* permite que BMP4 se una a él en la superficie de la membrana celular (también se une a *BMPRII*) favoreciendo la fosforilación de *SMAD1* y la expresión del gen *ALK1* el cual aumentará la expresión de *VEGF* y proteína de matriz Gla (*MGP*). También se ha reportado que *BMP9* inhibe el brote de células endoteliales y abole completamente la expresión de las estructuras tubulares dependientes de

VEGF, mediante la activación de ACVR1 (Scharpfenecker *et al.*, 2007). Sin embargo, en células madre de ratón se observó que BMP9 induce la secreción de VEGF a través de la fosforilación de SMAD1/5 por acción de ACVR1 (Subileau *et al.*, 2019). Por otro lado, también se reportó que BMP6 activa la angiogénesis a través de la activación de ACVR1 y que la inhibición de este receptor incrementa la longitud del brote angiogénico (Benn *et al.*, 2017).

Aunque no se encontraron reportes en la literatura de la interacción entre *ACVR1* y *COL11A1* existe evidencia de la influencia que tiene el receptor ACVR1 en la expresión de algunos componentes de la matriz extracelular del cartílago y otros tejidos. Por ejemplo, las células con la mutación de *ACVR1* R206H presentaron un incremento significativo de *COL2A1* y *COL1A1* (Barruet *et al.*, 2016); estos tipos de colágeno forman heterotrímeros con las fibrillas de *COL11A1* en la formación y desarrollo del tejido osteocartilaginoso (Tegeeder and Lötsch, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con BMP7, un reconocido activador de ACVR1, incrementa la expresión de mRNA de agregano y proteoglicanos como el hialuronato en condrocitos humanos con OA (Nishida, Knudson and Knudson, 2004b); Además, la inhibición de la expresión de BMP7 disminuye la expresión génica del agregano y otros componentes de la MEC en el cartílago sano (Söder *et al.*, 2005).

Por otro lado, la evidencia de la interacción entre *VEGF* y *COL11A1* se basa en un estudio en el cual la inyección intravítrea de Ranibizumab, un anticuerpo monoclonal recombinante que inhibe las formas activas de VEGF, demostró la capacidad de inhibir la expresión de *COL11A1*, y otras proteínas de la matriz extracelular (Nita and Strzałka-mrozik, 2014). La información recabada apoya la hipótesis de que estos genes interactúan de forma activa en distintos procesos y esto tiene efecto importante en el desarrollo de daño articular. Sin embargo, las variantes genéticas analizadas en este estudio demostraron tener efectos independientes o redundantes en la población y no se corroboró un efecto de epistasis sobre el fenotipo OA de rodilla.

Evidencia de epistasis e interacción genética de las vías en las que participan los genes *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1*, en otros estudios de interacción gen-gen con OA

En otros estudios de epistasis en OA se han analizado algunas de las vías y genes que fueron incluidos en nuestro estudio con resultados interesantes en cuanto al efecto de estas interacciones en distintas poblaciones, incluyendo estudios en pacientes del centro y occidente de México. Su *et al.* (Su *et al.*, 2015b), investigaron la asociación de las variantes de los genes de la vía TGF β /SMAD3/TIMP3, y sus interacciones, con OA de rodilla en la población taiwanesa. En el análisis de interacción con MDR observaron un modelo significativo de epistasis entre rs6494629 (*SMAD3*) y rs715572 (*TIMP3*), con una precisión de prueba máxima de 57.55% y una consistencia de validación cruzada de 10/10; con una ganancia de información individual de 0.41% (*SMAD*) y 0.75% (*TIMP3*), además del 0.60% de la interacción. En el análisis con MDR de nuestro estudio, rs1146031 (*ACVR1*, familia de receptores de la vía TGF β), presentó una GI individual de 0.02% y formó parte de un modelo de interacción con tendencia a la redundancia y efectos independientes, con otras variantes de *VEGF* y *COL11A1* (GI -0.01% y 0.01%, respectivamente). Esto sugiere que existe una mayor probabilidad de GI ante una mayor cercanía del accionar molecular de los actores de estas interacciones. Sería interesante conocer el efecto de los modelos de interacción en los que rs1146031 se involucra con otras variantes genéticas en la vía TGF β , y a su vez el efecto que podrían tener las interacciones de alto orden entre otras variantes genéticas de la vía con otras variantes relacionadas con el daño articular.

También se han descrito interacciones entre variantes de genes de las vías inflamatorias como *TNF α /IL4R* (rs1799964/rs1805015), *TNF α /IL10* (rs1799964/rs1800896), y *TNF α /IL10* (rs1800630/rs1800896) asociadas a OA de mano en el modelo de regresión logística [RM (IC95%) 2.01 (1.26-3.22); 2.54 (1.45-4.47); 2.60 (1.46-4.62), respectivamente) (Hämäläinen, Solovieva, Vehmas, Leino-Arjas, *et al.*, 2014b). En el presente estudio, se analizaron variantes de dos genes que codifican citosinas proinflamatorias, *LEP* y *VEGF*. El análisis MDR demostró que el modelo de interacción rs2167270/rs2010963 presenta un efecto de epistasis sinérgica con una GI de 0.43%, y

una consistencia de validación cruzada del modelo 10/10, en el fenotipo de OA de rodilla. Esta evidencia nos indica que la epistasis estadística es demostrable entre distintas variantes de los genes de las vías inflamatorias que participan en el desarrollo de distintos fenotipos de OA.

En los reportes de interacción gen-gen en población mexicana, se encontró interacción entre rs2615977 de *COL11A1* con variantes de los genes *WISP1* (rs3739262), *FRZB* (rs409238) (Fernández *et al.*, 2018b). También se analizó el papel de las variantes en genes de la vía *HIF1* que incluía algunas variantes de *VEGF*, sin embargo, en el análisis de MDR no se encontró un modelo de epistasis que las incluyera; aunque si encontraron un mejor modelo de interacción no lineal compuesto por rs8100018 (*IGF1*)-rs2288377 (*AKT2*), con una consistencia de validación cruzada 10/10, una precisión de balance de prueba de 0.77, valor de p menor a 0.01, GI individual y de interacción de 1.67%, 1.21% y 21.24%, respectivamente (Fernández-torres *et al.*, 2019b). En el presente estudio, la interacción entre rs25648 (*VEGF*) con rs1676486 (*COL11A1*) y rs3753841 (*COL11A1*), son redundantes (GI -0.07, en ambos casos), y mostró tener efectos independientes en su interacción con rs1146031 (*ACVR1*). Los estudios previos en población mexicana coinciden con el presentado actualmente respecto a la redundancia de los efectos de las variantes estudiadas de *VEGF*. Al igual que los reportes previos, en nuestro estudio encontramos un modelo de interacción en el que participaron las variantes de *COL11A1*; la diferencia entre ellos radica en que el software MDR permitió determinar que los efectos de las variantes rs1676486 y rs3753841 era redundante e independiente de otras variantes por lo que no corresponde a un efecto de epistasis, mientras que la regresión logística usada en el análisis de rs2615877 en el estudio de Fernández *et al.* presenta la limitante de no poder determinar el efecto de epistasis, además, de limitarse a evaluar interacciones entre pares.

Fortalezas y limitaciones del estudio

En la muestra parcial se estudiaron 294 sujetos de estudio y la muestra total estuvo compuesta por 879 individuos, por lo que una debilidad del estudio podría ser el tamaño de la muestra, principalmente la parcial. Sin embargo, tiene controles con una selección estricta para la edad e IMC,

excluye sujetos con historia de OA secundaria y selecciona a todos los sujetos del estudio de acuerdo a la clasificación de imágenes de rayos X evaluadas por un solo radiólogo cegado para los datos clínicos del paciente, reduciendo considerablemente la probabilidad de error sistemático y sesgos de información y clasificación.

Por otra parte, las variables demográficas y clínicas asociadas con OA de rodilla en las muestras parcial y total fueron incluidas en los modelos multivariados para el análisis de asociación de las variables genéticas. La edad es un factor de riesgo de OA ampliamente documentado y se ha observado en distintas poblaciones que la prevalencia e incidencia de la OA aumenta con la edad (Felson *et al.*, 1987; Jordan *et al.*, 2007; Greene and Loeser, 2015; Loeser, Collins and Diekman, 2016; Wallace *et al.*, 2017; Sacitharan, 2019). Por su parte, también hay algunos reportes de la asociación de HAS con OA (Calders and Van Ginckel, 2018; Veronese *et al.*, 2018). En la muestra total, se encontró asociación de la OA de rodilla con la edad, el IMC y enfermedades concomitantes como DMT2 y HAS. Como se discutió previamente, existen diversos reportes de asociación de la edad y HAS con OA. Así mismo, el IMC también es una variable conocida como factor de riesgo de OA como lo han demostrado diversos estudios de distintas poblaciones (Holmberg, Thelin and Thelin, 2005; Vrezas *et al.*, 2010; Kulkarni *et al.*, 2016; Reyes *et al.*, 2016; Halilaj *et al.*, 2018). Por otra parte, DMT2 no parece tener una asociación clara con OA aunque hay algunos estudios que así lo sugieren (Courties and Sellam, 2016; Rehling *et al.*, 2019; Veronese *et al.*, 2019; Khor *et al.*, 2020). Al incluir estas variables en el análisis multivariado se aumenta la validez interna del estudio porque evita su posible efecto confusor sobre las muestras de estudio durante el análisis de asociación genética.

Por otro lado, las herramientas estadísticas que se utilizaron para el análisis de epistasis son adecuadas para las condiciones del estudio (Ritchie *et al.*, 2001b; Moore *et al.*, 2006). Dentro de las ventajas del método MDR se encuentra el hecho de que puede evaluar la epistasis entre variantes genéticas que no necesariamente están asociadas de forma individual con el fenotipo estudiado. Además, es muy útil cuando se estudian muestras de tamaño pequeño o cuando se estudian pocas variantes genéticas.

Cabe mencionar que rs1676486 y rs2227861 no se encontraron en EHW en el grupo control de las muestras parcial y total, respectivamente, por lo que los resultados de sus análisis no se consideraron válidos en la etapa correspondiente del estudio. El EHW es un parámetro que indica si una muestra tiene la distribución genotípica esperada en una población con las mismas frecuencias alélicas observadas en la muestra de estudio, y permite explicar porque la variabilidad genética se mantiene relativamente estable en las poblaciones; sin embargo, para que esto suceda se deben suponer panmixia y una población infinita (Wang and Shete, 2017). La falta de EHW hace suponer que sobre la distribución genética en una muestra intervienen otros fenómenos como una reproducción sesgada, mutaciones, deriva génica, migración de poblaciones o efecto fundador. Otras situaciones que pueden causar una falta de EHW en los estudios de investigación son los sesgos de selección, errores sistemáticos y aleatorios, entre ellos, los errores de genotipificación (Chen, Cole and Grond-Ginsbach, 2017). Estos factores representan un sesgo importante en la validez de la interpretación de los resultados de un análisis genético. En este estudio, la estandarización de la genotipificación y la reproducibilidad se corroboró en cada uno de los ensayos de las variantes analizadas, ya que en cada experimento de PCR en tiempo real se incluyeron muestras control (previamente conocidas y replicadas ampliamente) de cada genotipo de la variante estudiada en turno. Esto nos sugiere que tiene una probabilidad baja de sesgos relacionados con estos aspectos. También es importante considerar que los participantes fueron captados en un centro nacional de referencia para la atención hospitalaria, esto quiere decir que su población proviene de un contexto geográfico y genético de todo el país (datos no mostrados). Sin embargo, el tamaño de las muestras de estudio fue pequeño y esto influye de forma importante en la probabilidad de que hayamos podido reclutar, o no, sujetos con un genotipo con frecuencia esperada pequeña, como fue el caso del genotipo AA de rs1676486 en el grupo control de la muestra parcial. Esto último se pudo comprobar porque rs1676486 se encontró en EHW en la muestra total. Vale la pena mencionar, que existen reportes previos en la literatura de que el alelo A de rs1676486 tiene un efecto negativo significativo en la expresión de COL11A1 en el cartílago (Mio *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2017), aunque no se encontró asociado al riesgo de desarrollar OA en un estudio de Reino Unido

(Raine *et al.*, 2013). Del rs2227861 de *ACVR1* no existen reportes sobre su asociación con OA. De cualquier manera, para evitar la posibilidad de sesgos en la interpretación de nuestro análisis, decidimos considerar como insuficiente la validez de los resultados de este par de variantes en las fases de análisis que corresponden a cada una.

CONCLUSIONES

En la muestra parcial, las variantes rs2167270 (*LEP*) y rs2010963 (*VEGF*) no se encontraron asociadas con OA de rodilla de forma independiente en la población mexicana. No obstante, existe epistasis entre rs2167270 (*LEP*) y rs2010963 (*VEGF*) que puede influir en el desarrollo de OA primaria de rodilla.

En la muestra total, no se encontró asociación entre las variantes rs1146031 (*ACVR1*), rs1676486 (*COL11A1*), y rs25648 (*VEGF*) con el desarrollo de OA de rodilla. El genotipo *GA* de rs3753841 (*COL11A1*) se asocia con OA leve de rodilla, mientras que el alelo *A* se asocia al riesgo de OA moderada. Las variantes rs1146031, rs1676486, rs3753841 y rs25648 presentan efectos independientes y/o redundantes sobre el fenotipo de OA de rodilla.

Es importante replicar estas asociaciones con estudios en otras poblaciones y, de ser posible, con tamaños de muestra mayores.

ABREVIATURAS

A

ACVR1. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 31, 32, 33, 39, 40, 42, 48, 50, 54, 56, 58, 61, 68, 69, 71, 72, 82, 87, 88, 89, 90, 91, 94, 96, 103, 118, 122, 126
Receptor de activina tipo 124
ADAMTS
A desintegrinas y metaloproteinasas con motivos de trombospondina...18, 19, 106
ADIPOQ
Adiponectina Q37, 100
AKT
Proteína cinasa B18, 85
AKT2
Serina/treonina AKT cinasa tipo 237, 91
AOC3
Amino oxidasa que contiene cobre 385
AP1
Proteína activadora 119
ATM
Articulación temporo-mandibular27

B

BCAP29
Proteína asociada a receptor de células B tipo 29.....38
BCL2L1
Proteína similar a BCL2 tipo 125
BMP
Proteína morfogenética de hueso.....17, 20, 31, 32, 88, 96, 97, 98, 104, 112, 116
B-myb
Oncogén viral de mieloblastosis B.....29

C

c/EBPB
Proteína potenciadora de CCAAT beta ...29
CA
Cartílago articular 6, 13, 15, 17, 18, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 48, 49, 50, 83
CDC42
Proteína de control de división celular....18
COG5
Componente del complejo oligomérico de Golgi tipo 538
COL11A1

Cadena de colágena 11A1... 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 29, 30, 37, 39, 40, 42, 48, 50, 54, 56, 58, 60, 61, 63, 64, 68, 69, 71, 72, 74, 78, 82, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 94, 95, 106, 107, 110, 114, 115, 118, 122, 126
CS
Condroitin sulfato 16

D

DMT2
Diabetes mellitus tipo 2..52, 53, 57, 58, 60, 92

E

EC
Enfermedad celiaca 85
EHW
Equilibrio de Hardy-Weinberg 43, 57, 59, 60, 63, 65, 68, 70, 71, 93, 94
ERK
Cinasa regulada por señales extracelulares 20, 85
ESR1
Receptor de estrógenos 1 25

F

FGF
Factor de crecimiento de fibroblastos 17, 18, 97
FMN2
Formina 2 37
FOP
Fibrodiasplasia osificante progresiva 32, 104
FRZB
Proteína relacionada Frizzled 37, 91

G

GADD
Proteína inducible por arresto celular y daño a DNA 16
GEO
Análisis de expresión génica omnibus.... 85
GI

Ganancia de información....4, 5, 36, 45, 46,
58, 61, 77, 81, 87, 90, 91
Gly
Glicina.....16
Gnai3
Subunidad alfa I3 de proteína G.....37
GWAS
Estudios de asociación amplios del
genoma ... 24, 28, 30, 35, 37, 38, 87, 113

H

HAS
Hipertensión arterial sistémica....52, 53, 56,
57, 58, 60, 62, 67, 92
HDL
Lipoproteínas de alta densidad.....88
HFE
Regulador homeostático de hierro.....38
HIF1 α
Factor inducido por hipoxia tipo 1.....16
HS
Hueso subcondral.... 13, 15, 17, 20, 21, 22,
27, 28, 50
HSP
Proteína de shock por calor.....30

I

IGF
Factor de crecimiento similar a insulina .17,
99
IGFBP
Proteínas de unión a IGF.....17
IL1
Interleucina 119
Interleucina tipo 119, 20, 25
IL1RI
Receptor de IL1 tipo 119
IL4R
Receptor de interleucina 4.....38, 90, 102
IMC
Índice de masa corporal .26, 28, 41, 51, 53,
56, 58, 60, 62, 67, 92
ISSSTE
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales
de los Trabajadores del Estado14

J

JNK
Cinasa JUN N terminal20

K

KFL10
Factor tipo Kluffer 10.....31
KL
Escala radiológica de Kellgren-Lawrence
.....41, 42, 59, 71, 72, 73

L

Lef1
Factor de unión a potenciador linfoide 1. 29
LEP
Leptina.... 1, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 25, 26, 28, 39,
40, 42, 48, 50, 54, 56, 58, 63, 64, 66, 82,
83, 84, 85, 86, 89, 90, 94, 99, 118, 122,
126
LINC01990
RNA largo intergénico no codificante de
proteína 1990.....38

M

mAF
Frecuencia del alelo menor ... 35, 47, 54, 57
MAPK
Proteína cinasa activada-mitógena-RAS18,
20, 25
MDFIC2
Familia MyoD que contienen dominio
inhibidor tipo 238
MDR
Reducción de la dimensionalidad
multifactorial.. 4, 5, 7, 8, 9, 35, 36, 37, 44,
45, 55, 57, 60, 66, 75, 76, 79, 84, 90, 91,
93
MEC
Matriz extracelular 15, 16, 17, 18, 19, 20,
21, 22, 25, 26, 28, 29, 31, 39, 83, 88, 89
Met
Proteína cinasa Met37
MFAP5
Proteína asociada a microfibrillas 529
MGP
Proteína de matriz Gla88
MMP
Metaloproteínasa.....18, 19, 20

N

NFkB
Factor nuclear potenciador de las cadenas
ligeras kappa de las células B activadas
.....19, 22
NF-Y

Factor de transcripción nuclear	29	Sp1	
		Proteína específica 1	29
		STAT3	
		Transductor de señal y activador de la	
		transcripción tipo 3	25, 85
		T	
		TGFB	
		Factor de crecimiento transformante B..	17,
			20, 26, 31, 32, 88
		TIMP	
		Proteína inhibidora de proteasas	20
		TNFR1	
		Receptor específico de factor de necrosis	
		tumoral.....	19
		TNF α	
		Factor de necrosis tumoral α	19, 28, 38, 90,
			102
		TSPAN15	
		Tetraspanina 15	38
		U	
		<i>Ubb</i>	
		Ubiquitina B	37
		UTR 5'	
		Región 5' no traducida	26
		V	
		VC	
		Validación cruzada	45, 66, 75
		VEGF	
		Factor de crecimiento endotelial vascular 1,	
			4, 5, 6, 7, 8, 16, 24, 27, 28, 39, 40, 42,
			48, 50, 54, 56, 58, 61, 63, 64, 66, 68, 69,
			82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 94,
			97, 99, 102, 107, 112, 116, 118, 122,
			126
		W	
		WISP1	
		Proteína inducible por la vía WNT1 tipo 1	
		37, 91
		WNT	
		Proteína tipo-sin alas	22
		Z	
		ZNF773	
		Proteína dedos de zinc 773	38

REFERENCIAS

Altman, R. *et al.* (1986) 'Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee', *Arthritis & Rheumatism*, 29(8), pp. 1039–1049. doi:10.1002/art.1780290816.

Annunen, S. *et al.* (1999) 'Splicing Mutations of 54-bp Exons in the COL11A1 Gene Cause Marshall Syndrome, but Other Mutations Cause Overlapping Marshall/Stickler Phenotypes', *The American Journal of Human Genetics*, 65(4), pp. 974–983. doi:10.1086/302585.

Artwohl, M. *et al.* (2002) 'Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells', *International Journal of Obesity*, 26(4), pp. 577–580. doi:10.1038/sj.ijo.0801947.

Aubourg, G. *et al.* (2021) 'Genetics of osteoarthritis', *Osteoarthritis and Cartilage* [Preprint]. doi:10.1016/j.joca.2021.03.002.

Awadalla, M.S. *et al.* (2013) 'Association of Genetic Variants with Primary Angle Closure Glaucoma in Two Different Populations', 8(6), pp. 1–5. doi:10.1371/journal.pone.0067903.

Barruet, E. *et al.* (2016) 'The ACVR1 R206H mutation found in fibrodysplasia ossificans progressiva increases human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cell formation and collagen production through BMP-mediated SMAD1/5/8 signaling', *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), p. 115. doi:10.1186/s13287-016-0372-6.

Baugé, C *et al.* (2014) 'Regulation and Role of TGF β Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints', *aging and disease*, 5(6), pp. 394–405. doi:10.14336/AD.2014.0500394.

Baugé, C. *et al.* (2014) 'Regulation and Role of TGF β Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints', *aging and disease*, 5(6), pp. 394–405. doi:10.14336/AD.2014.0500394.

Benn, A. *et al.* (2017) 'Role of bone morphogenetic proteins in sprouting angiogenesis: differential BMP receptor-dependent signaling pathways balance stalk vs . tip cell competence', *The FASEB Journal*, 31(11), pp. 4720–4733. doi:10.1096/fj.201700193RR.

Berenbaum, F. and Walker, C. (2020) 'Osteoarthritis and inflammation: a serious disease with overlapping phenotypic patterns', *Postgraduate Medicine*, 132(4), pp. 377–384. doi:10.1080/00325481.2020.1730669.

Boer, T.N. de *et al.* (2012) 'Serum adipokines in osteoarthritis; comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage', *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(8), pp. 846–853. doi:10.1016/j.joca.2012.05.002.

Borges-Yañez, S. and Gómez-Dantés, H. (1998) 'Uso de los servicios de salud por la población de 60 años y más en México', *Salud Publica Mex*, 40, pp. 13–23.

Brown, R.J. *et al.* (2011) 'Proteomic analysis of Col11a1-associated protein complexes', *PROTEOMICS*, 11(24), pp. 4660–4676. doi:10.1002/pmic.201100058.

Calders, P. and Van Ginckel, A. (2018) 'Presence of comorbidities and prognosis of clinical symptoms in knee and/or hip osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis', *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(6), pp. 805–813. doi:10.1016/j.semarthrit.2017.10.016.

Cao, R. *et al.* (2001) 'Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), pp. 6390–6395. doi:10.1073/pnas.101564798.

Castañeda, S. *et al.* (2012) 'Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment', *Biochemical Pharmacology*, 83(3), pp. 315–323. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.018.

De Ceuninck, F. *et al.* (2004) 'Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes.', *Arthritis research & therapy*, 6(5), pp. R393-403. doi:10.1186/ar1201.

Chattopadhyay, A. and Lu, T.-P. (2019) 'Gene-gene interaction: the curse of dimensionality', *Annals of Translational Medicine*, 7(24), pp. 813–813. doi:10.21037/atm.2019.12.87.

Chen, B., Cole, J.W. and Grond-Ginsbach, C. (2017) 'Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error', *Frontiers in Genetics*, 8, p. 167. doi:10.3389/fgene.2017.00167.

Chen, Y. *et al.* (2019) 'HIF-1-VEGF-Notch mediates angiogenesis in temporomandibular joint osteoarthritis.', *American journal of translational research*, 11(5), pp. 2969–2982.

Chubinskaya, S., Hurtig, M. and Rueger, D.C. (2007a) 'OP-1/BMP-7 in cartilage repair', *International Orthopaedics*, 31(6), pp. 773–781. doi:10.1007/s00264-007-0423-9.

Chubinskaya, S., Hurtig, M. and Rueger, D.C. (2007b) 'OP-1/BMP-7 in cartilage repair', *International Orthopaedics*, 31(6), pp. 773–781. doi:10.1007/s00264-007-0423-9.

Claessen, K.M.J.A. *et al.* (2012) 'Relationship between insulin-like growth factor-1 and radiographic disease in patients with primary osteoarthritis: a systematic review', *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(2), pp. 79–86. doi:10.1016/j.joca.2011.11.012.

Cordell, H.J. (2002) 'Epistasis : what it means , what it doesn ' t mean , and statistical methods to detect it in humans', 11(20), pp. 2463–2468.

Courties, A. and Sellam, J. (2016) 'Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links?', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 122, pp. 198–206. doi:10.1016/j.diabres.2016.10.021.

Cross, M. *et al.* (2014) 'The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7), pp. 1323–1330. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204763.

Culbert, A.L. *et al.* (2014) 'Alk2 Regulates Early Chondrogenic Fate in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Heterotopic Endochondral Ossification', *STEM CELLS*, 32(5), pp. 1289–1300. doi:10.1002/stem.1633.

Dada, S. *et al.* (2016) 'Carpal tunnel syndrome : The role of collagen gene variants', *Gene*, 587(1), pp. 53–58. doi:10.1016/j.gene.2016.04.030.

Daniels, T.E. *et al.* (2020) 'Associations of maternal diet and placenta leptin methylation', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 505, p. 110739. doi:10.1016/j.mce.2020.110739.

Dasgupta, S. *et al.* (2015) 'Genetic variants in leptin: Determinants of obesity and leptin levels in South Indian population', *Adipocyte*, 4(2), pp. 135–140. doi:10.4161/21623945.2014.975538.

Denver, R.J., Bonett, R.M. and Boorse, G.C. (2011) 'Evolution of Leptin Structure and Function', *Neuroendocrinology*, 94(1), pp. 21–38. doi:10.1159/000328435.

Domingo, J., Baeza-Centurion, P. and Lehner, B. (2019) 'The Causes and Consequences of Genetic Interactions (Epistasis)', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 20(1), pp. 433–460. doi:10.1146/annurev-genom-083118-014857.

Duan, D.-M. *et al.* (2020) 'Modification effect of sex and obesity on the correlation of LEP polymorphisms with leptin levels in Taiwanese obese women', *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(3). doi:10.1002/mgg3.1113.

Duan, X. *et al.* (2011) '[Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the synovium of patients with osteoarthritis].', *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 31(1), pp. 117–20.

Eichmann, A. and Simons, M. (2012) 'VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond', *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), pp. 188–193. doi:10.1016/j.ceb.2012.02.002.

Felson, D.T. *et al.* (1987) 'The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study', *Arthritis & Rheumatism*, 30(8), pp. 914–918. doi:10.1002/art.1780300811.

Fernández, J. *et al.* (2018a) 'Gene – gene interactions of the Wnt / β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis', *Molecular Biology Reports*, 0(0), p. 0. doi:10.1007/s11033-018-4260-2.

Fernández, J. *et al.* (2018b) 'Gene – gene interactions of the Wnt / β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis', *Molecular Biology Reports*, 0(0), p. 0. doi:10.1007/s11033-018-4260-2.

Fernández, J. *et al.* (2019) 'Epistasis between ADIPOQ rs1501299 and PON1 rs662 polymorphisms is potentially associated with the development of knee osteoarthritis', *Molecular Biology Reports*, 0(0), p. 0. doi:10.1007/s11033-019-04654-5.

Fernández-torres, J. *et al.* (2019a) 'Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development'.

Fernández-torres, J. *et al.* (2019b) 'Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development'.

Frezzetti, D. *et al.* (2016) 'Vascular Endothelial Growth Factor A Regulates the Secretion of Different Angiogenic Factors in Lung Cancer Cells: ANGIOGENIC GROWTH FACTORS IN LUNG CANCER', *Journal of Cellular Physiology*, 231(7), pp. 1514–1521. doi:10.1002/jcp.25243.

Frühbeck, G. (2006) 'Intracellular signalling pathways activated by leptin', *Biochemical Journal*, 393(1), pp. 7–20. doi:10.1042/BJ20051578.

Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., *et al.* (2011) 'No association between polymorphisms/haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia', *BMC Pregnancy and Childbirth*, 11(1), p. 35. doi:10.1186/1471-2393-11-35.

Garza-Veloz, I., Rosa, C.C.-D. la, *et al.* (2011) 'No association between polymorphisms/haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia', *BMC Pregnancy and Childbirth*, 11(1), p. 35. doi:10.1186/1471-2393-11-35.

Gholizadeh, E. *et al.* (2020) 'Showing NAFLD, as a key connector disease between Alzheimer's disease and diabetes via analysis of systems biology', *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(Suppl1), pp. S89–S97.

Goldring, M.B. and Goldring, S.R. (2010) 'Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), pp. 230–237. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x.

Gorska, E. *et al.* (2010) 'Leptin receptors', *European Journal of Medical Research*, 15(S2), p. 50. doi:10.1186/2047-783X-15-S2-50.

Greene, M.A. and Loeser, R.F. (2015) 'Aging-related inflammation in osteoarthritis', *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), pp. 1966–1971. doi:10.1016/j.joca.2015.01.008.

Gui, J. *et al.* (2010) 'A Simple and Computationally Efficient Sampling Approach to Covariate Adjustment for Multifactor Dimensionality Reduction Analysis of Epistasis', *Human Heredity*, 70(3), pp. 219–225. doi:10.1159/000319175.

Hafez, A. *et al.* (2015a) 'Col11a1 Regulates Bone Microarchitecture during Embryonic Development', *Journal of Developmental Biology*, 3(4), pp. 158–176. doi:10.3390/jdb3040158.

Hafez, A. *et al.* (2015b) 'Col11a1 Regulates Bone Microarchitecture during Embryonic Development', *Journal of Developmental Biology*, 3(4), pp. 158–176. doi:10.3390/jdb3040158.

Halilaj, E. *et al.* (2018) 'Modeling and predicting osteoarthritis progression: data from the osteoarthritis initiative', *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(12), pp. 1643–1650. doi:10.1016/j.joca.2018.08.003.

Hämäläinen, S., Solovieva, S., Vehmas, T., Luoma, K., *et al.* (2014) 'Genetic Influences on Hand Osteoarthritis in Finnish Women – A Replication Study of Candidate Genes', *PLoS ONE*. Edited by L. Prokunina-Olsson, 9(5), p. e97417. doi:10.1371/journal.pone.0097417.

Hämäläinen, S., Solovieva, S., Vehmas, T., Leino-Arjas, P., *et al.* (2014a) 'Variations in the TNF α gene and their interactions with the IL4R and IL10 genes in relation to hand osteoarthritis', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15(1), p. 311. doi:10.1186/1471-2474-15-311.

Hämäläinen, S., Solovieva, S., Vehmas, T., Leino-Arjas, P., *et al.* (2014b) 'Variations in the TNF α gene and their interactions with the IL4R and IL10 genes in relation to hand osteoarthritis', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15(1), p. 311. doi:10.1186/1471-2474-15-311.

Hämäläinen, S. *et al.* (2018) 'Adipokine genes and radiographic hand osteoarthritis in Finnish women: a cross-sectional study', *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 47(1), pp. 71–78. doi:10.1080/03009742.2017.1314000.

Hamilton, J.L. *et al.* (2016) 'Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain', *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(5), pp. 911–924. doi:10.1002/jbmr.2828.

Hanna, C.W. *et al.* (2010) 'Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage', *Human Reproduction*, 25(10), pp. 2664–2671. doi:10.1093/humrep/deq211.

Hashimoto, M. *et al.* (2008) 'Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis', *Medicinal Research Reviews*, 28(3), pp. 464–481. doi:10.1002/med.20113.

Hatsell, S.J. *et al.* (2015) 'ACVR1 R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A', *Science Translational Medicine*, 7(303). doi:10.1126/scitranslmed.aac4358.

Hay, M. *et al.* (2013) 'Association of type XI collagen genes with chronic Achilles tendinopathy in independent populations from South Africa and Australia', pp. 569–574. doi:10.1136/bjsports-2013-092379.

Herrero-Beaumont, G. *et al.* (2009) 'Primary Osteoarthritis No Longer Primary: Three Subsets with Distinct Etiological, Clinical, and Therapeutic Characteristics', *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 39(2), pp. 71–80. doi:10.1016/j.semarthrit.2009.03.006.

Holmberg, S., Thelin, A. and Thelin, N. (2005) 'Knee osteoarthritis and body mass index: a population-based case-control study', *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 34(1), pp. 59–64. doi:10.1080/03009740510017922.

Iniesta, R., Guinó, E. and Moreno, V. (2005) 'Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos', *Gaceta Sanitaria*, 19(4), pp. 333–341. doi:10.1157/13078029.

Isse, N. *et al.* (1995) 'Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Human obese Gene', *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), pp. 27728–27733. doi:10.1074/jbc.270.46.27728.

Jordan, J.M. *et al.* (2007) 'Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project.', *The Journal of rheumatology*, 34(1), pp. 172–80.

Kaplan, F.S., Pignolo, R.J. and Shore, E.M. (2009) 'The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5–6), pp. 399–407. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.006.

Kaplan, Frederick S, Pignolo, R.J. and Shore, E.M. (2013) 'From mysteries to medicines: drug development for fibrodysplasia ossificans progressiva', *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(8), pp. 637–649. doi:10.1517/21678707.2013.825208.

Kaplan, Frederick S., Pignolo, R.J. and Shore, E.M. (2013) 'From mysteries to medicines: drug development for fibrodysplasia ossificans progressiva', *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(8), pp. 637–649. doi:10.1517/21678707.2013.825208.

Kapoor, M. *et al.* (2011) 'Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), pp. 33–42. doi:10.1038/nrrheum.2010.196.

Kellgren, J.H. and Lawrence, J.S. (1957) 'Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4), pp. 494–502. doi:10.1136/ard.16.4.494.

Kellgren, J.H., Lawrence, J.S. and Bier, F. (1963) 'Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 22(4), pp. 237–255. doi:10.1136/ard.22.4.237.

Khazaei, M. and Tahergorabi, Z. (2015) 'Leptin and its cardiovascular effects: Focus on angiogenesis', *Advanced Biomedical Research*, 4(1), p. 79. doi:10.4103/2277-9175.156526.

Khor, A. *et al.* (2020) 'Diabetes mellitus is not a risk factor for osteoarthritis', *RMD Open*, 6(1), p. e001030. doi:10.1136/rmdopen-2019-001030.

Kohn, M.D., Sassoon, A.A. and Fernando, N.D. (2016) 'Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis', *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 474(8), pp. 1886–1893. doi:10.1007/s11999-016-4732-4.

Kulkarni, K. *et al.* (2016) 'Obesity and osteoarthritis', *Maturitas*, 89, pp. 22–28. doi:10.1016/j.maturitas.2016.04.006.

Lee, C.S. *et al.* (2012) 'Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration', *Stem Cell Research & Therapy*, 3(4), p. 35. doi:10.1186/scrt126.

Lesseur, C. *et al.* (2013) 'Tissue-specific Leptin promoter DNA methylation is associated with maternal and infant perinatal factors', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 381(1–2), pp. 160–167. doi:10.1016/j.mce.2013.07.024.

Leung, D. *et al.* (1989) 'Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen', *Science*, 246(4935), pp. 1306–1309. doi:10.1126/science.2479986.

Liapakis, I. *et al.* (2008) 'Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats', *Acta Cirurgica Brasileira*, 23(2), pp. 118–124. doi:10.1590/S0102-86502008000200002.

Liu, C. *et al.* (2021) 'Evaluation of Primary Angle-Closure Glaucoma Susceptibility Loci for Estimating Angle Closure Disease Severity', *Ophthalmology*, 128(3). doi:10.1016/j.ophtha.2020.07.027.

Liu, W. *et al.* (2017) 'A genetic variant in COL11A1 is functionally associated with lumbar disc herniation in Chinese population', *Journal of Genetics*, 96(6), pp. 867–872. doi:10.1007/s12041-017-0874-8.

Liu, W. *et al.* (2020) 'Human osteoarthritis cartilage-derived stromal cells activate joint degeneration through TGF-beta lateral signaling', *The FASEB Journal*, 34(12), pp. 16552–16566. doi:10.1096/fj.202001448R.

Loeser, R.F., Collins, J.A. and Diekman, B.O. (2016) 'Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 12(7), pp. 412–420. doi:10.1038/nrrheum.2016.65.

Luo, Y. *et al.* (2017) 'The minor collagens in articular cartilage', *Protein & Cell*, 8(8), pp. 560–572. doi:10.1007/s13238-017-0377-7.

Marshall, M. *et al.* (2018) 'Hand osteoarthritis: clinical phenotypes, molecular mechanisms and disease management', *Nature Reviews Rheumatology*, 14(11), pp. 641–656. doi:10.1038/s41584-018-0095-4.

Martel-Pelletier, J. *et al.* (2016) 'Osteoarthritis', *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), p. 16072. doi:10.1038/nrdp.2016.72.

Mead, T.J. and Apte, S.S. (2018) 'ADAMTS proteins in human disorders', *Matrix Biology*, 71–72, pp. 225–239. doi:10.1016/j.matbio.2018.06.002.

Mehana, E.-S.E., Khafaga, A.F. and El-Blehi, S.S. (2019) 'The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review', *Life Sciences*, 234, p. 116786. doi:10.1016/j.lfs.2019.116786.

Mio, F. *et al.* (2007) 'A Functional Polymorphism in COL11A1, Which Encodes the $\alpha 1$ Chain of Type XI Collagen, Is Associated with Susceptibility to Lumbar Disc Herniation', *The American Journal of Human Genetics*, 81(6), pp. 1271–1277. doi:10.1086/522377.

Moore, J.H. *et al.* (2006) 'A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility', *Journal of Theoretical Biology*, 241(2), pp. 252–261. doi:10.1016/j.jtbi.2005.11.036.

Moore, J.H. (2010) *Detecting, Characterizing, and Interpreting Nonlinear Gene-Gene Interactions Using Multifactor Dimensionality Reduction*. 1st edn, *Advances in Genetics*. 1st edn. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-380862-2.00005-9.

Moore, J.H. and Andrews, P.C. (2015) 'Epistasis Analysis Using Multifactor Dimensionality Reduction', in, pp. 301–314. doi:10.1007/978-1-4939-2155-3_16.

Motsinger, A.A. and Ritchie, M.D. (2006) 'Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene - gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies', *Human Genomics*, 2(5), p. 318. doi:10.1186/1479-7364-2-5-318.

Motyl, K.J. and Rosen, C.J. (2012) 'Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis', *Biochimie*, 94(10), pp. 2089–2096. doi:10.1016/j.biochi.2012.04.015.

Murata, M., Yudoh, K. and Masuko, K. (2008) 'The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage', *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(3), pp. 279–286. doi:10.1016/j.joca.2007.09.003.

Murk, W. and Dewan, A.T. (2016) 'Exhaustive Genome-Wide Search for SNP-SNP Interactions Across 10 Human Diseases', 6(July), pp. 2043–2050. doi:10.1534/g3.116.028563.

Murphy, L. *et al.* (2008) 'Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis', *Arthritis & Rheumatism*, 59(9), pp. 1207–1213. doi:10.1002/art.24021.

Nallanthighal, S., Heiserman, J.P. and Cheon, D.-J. (2021) 'Collagen Type XI Alpha 1 (COL11A1): A Novel Biomarker and a Key Player in Cancer', *Cancers*, 13(5), p. 935. doi:10.3390/cancers13050935.

Nan, H., Dorgan, J.F. and Rebbeck, T.R. (2014) 'Genetic variants in anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone receptor genes and breast cancer risk in Caucasians and African Americans.', *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 5(3), pp. 145–51.

Nishida, Y., Knudson, C.B. and Knudson, W. (2004a) 'Osteogenic Protein-1 inhibits matrix depletion in a hyaluronan hexasaccharide-induced model of osteoarthritis¹¹Supported in part by NIH grants P50-AR39239, RO1-AR43384 (WK), RO1-AR39507 (CBK) and grants from the Arthritis Foundation', *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(5), pp. 374–382. doi:10.1016/j.joca.2004.01.008.

Nishida, Y., Knudson, C.B. and Knudson, W. (2004b) 'Osteogenic Protein-1 inhibits matrix depletion in a hyaluronan hexasaccharide-induced model of osteoarthritis¹¹Supported in part by NIH grants

P50-AR39239, RO1-AR43384 (WK), RO1-AR39507 (CBK) and grants from the Arthritis Foundation', *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(5), pp. 374–382. doi:10.1016/j.joca.2004.01.008.

Nita, M. and Strzałka-mrozik, B. (2014) 'Influence of ranibizumab treatment on the extracellular matrix in patients with neovascular age-related macular degeneration', pp. 875–883. doi:10.12659/MSM.890031.

Nongpiur, M.E. *et al.* (2018) 'Evaluation of Primary Angle-Closure Glaucoma Susceptibility Loci in Patients with Early Stages of Angle-Closure Disease', *Ophthalmology*, 125(5). doi:10.1016/j.ophtha.2017.11.016.

Nwadozi, E. *et al.* (2019) 'Leptin is a physiological regulator of skeletal muscle angiogenesis and is locally produced by PDGFR α and PDGFR β expressing perivascular cells', *Angiogenesis*, 22(1), pp. 103–115. doi:10.1007/s10456-018-9641-6.

Oliveria, S.A. *et al.* (1995) 'Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization', *Arthritis & Rheumatism*, 38(8), pp. 1134–1141. doi:10.1002/art.1780380817.

Park, H.-K. and Ahima, R.S. (2014) 'Leptin signaling', *F1000Prime Reports*, 6. doi:10.12703/P6-73.

Park, H.-Y. *et al.* (2001) 'Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro', *Experimental & Molecular Medicine*, 33(2), pp. 95–102. doi:10.1038/emm.2001.17.

De Pavio-Mota, E., Larios-González, M. and Briceño-Cortés, G. (2005) 'Manejo de la osteoartrosis en medicina familiar y ostopedia', *Arch Med Fam*, 7, pp. 93–98.

Philip, A. (2012) 'TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis', *Frontiers in Bioscience*, S4(1), p. 266. doi:10.2741/s266.

Phillips, P.C. (2008) 'Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems', *Nature Reviews Genetics*, 9(11), pp. 855–867. doi:10.1038/nrg2452.

Prein, C. and Beier, F. (2019) 'ECM signaling in cartilage development and endochondral ossification', in, pp. 25–47. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.11.003.

Pritzker, K.P.H. *et al.* (2006) 'Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging', *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1), pp. 13–29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014.

Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. (1995) 'COLLAGENS: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy', *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), pp. 403–434. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002155.

Qin, J. *et al.* (2010) 'Association of the leptin gene with knee osteoarthritis susceptibility in a Han Chinese population: A case-control study', *Journal of Human Genetics*, 55(10), pp. 704–706. doi:10.1038/jhg.2010.86.

Raine, E.V.A. *et al.* (2012) 'Gene expression analysis reveals HBP1 as a key target for the osteoarthritis susceptibility locus that maps to chromosome 7q22', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(12), pp. 2020–2027. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201304.

Raine, E.V.A. *et al.* (2013) 'Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility gene COL11A1 in human joint tissues', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1), p. 85. doi:10.1186/1471-2474-14-85.

Rehling, T. *et al.* (2019) 'Diabetes Is Associated with Musculoskeletal Pain, Osteoarthritis, Osteoporosis, and Rheumatoid Arthritis', *Journal of Diabetes Research*, 2019, pp. 1–6. doi:10.1155/2019/6324348.

Ren, Y. *et al.* (2018) 'Exploring the Key Genes and Pathways of Osteoarthritis in Knee Cartilage in a Rat Model Using Gene Expression Profiling', 59(6), pp. 760–768.

Reyes, C. *et al.* (2016) 'Association Between Overweight and Obesity and Risk of Clinically Diagnosed Knee, Hip, and Hand Osteoarthritis: A Population-Based Cohort Study: OVERWEIGHT/OBESITY AND THE RISK OF DEVELOPING OA', *Arthritis & Rheumatology*, 68(8), pp. 1869–1875. doi:10.1002/art.39707.

Rezaei-Tavirani, S., Rostami-Nejad, M. and Montazar, F. (2019) 'Highlighted role of VEGFA in follow up of celiac disease', *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12(3), pp. 254–259.

Ripmeester, E.G.J. *et al.* (2021) 'BMP7 reduces the fibrocartilage chondrocyte phenotype', *Scientific Reports*, 11(1), p. 19663. doi:10.1038/s41598-021-99096-0.

Ritchie, M.D. *et al.* (2001a) 'Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer', *The American Journal of Human Genetics*, 69(1), pp. 138–147. doi:10.1086/321276.

Ritchie, M.D. *et al.* (2001b) 'Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer', *The American Journal of Human Genetics*, 69(1), pp. 138–147. doi:10.1086/321276.

Rodriguez, R.R. *et al.* (2004) 'A type XI collagen mutation leads to increased degradation of type II collagen in articular cartilage¹¹Supported by NIH Grants #AR46362 and #AR48839', *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(4), pp. 314–320. doi:10.1016/j.joca.2003.12.002.

Rodriguez-Amado, J. *et al.* (2016) 'The Social Gap Index and the prevalence of osteoarthritis in the community: a cross-sectional multilevel study in Mexico', *Clinical Rheumatology*, 35(1), pp. 175–182. doi:10.1007/s10067-014-2776-y.

Rodriguez-fontenla, C., Calaza, M., Evangelou, E., Valdes, Ana M, *et al.* (2014) 'Assessment of Osteoarthritis Candidate Genes in a Meta-Analysis of Nine Genome-Wide Association Studies', 66(4), pp. 940–949. doi:10.1002/art.38300.

Rodriguez-fontenla, C., Calaza, M., Evangelou, E., Valdes, Ana M., *et al.* (2014) 'Assessment of Osteoarthritis Candidate Genes in a Meta-Analysis of Nine Genome-Wide Association Studies', 66(4), pp. 940–949. doi:10.1002/art.38300.

Ruggiero, D. *et al.* (2011) 'Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms', *PLoS ONE*. Edited by A. Toland, 6(2), p. e16982. doi:10.1371/journal.pone.0016982.

Sacitharan, P.K. (2019) 'Ageing and Osteoarthritis', in Harris, J.R. and Korolchuk, V.I. (eds) *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science*. Singapore: Springer Singapore (Subcellular Biochemistry), pp. 123–159. doi:10.1007/978-981-13-3681-2_6.

Sakka, R. *et al.* (2015) '[Marshall syndrome: Clinical, radiological and genetical features of a Tunisian family].', *La Tunisie medicale*, 93(3), pp. 170–4.

Sánchez-Enríquez, S. *et al.* (2008) 'Increase levels of apo-A1 and apo B are associated in knee osteoarthritis: Lack of association with VEGF-460 T/C and +405 C/G polymorphisms', *Rheumatology International*, 29(1), pp. 63–68. doi:10.1007/s00296-008-0633-5.

Scharpfenecker, M. *et al.* (2007) 'BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis', 1, pp. 964–972. doi:10.1242/jcs.002949.

Schlesselman, J. (1982) 'Case-control studies', in *Case-control studies. Design conduct analysis*. New York: Oxford University Press.

Scientific, T. (no date) *How taqman assays works*. Available at: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.

Scotece, M. *et al.* (2014) 'Adiponectin and Leptin: New Targets in Inflammation', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(1), pp. 97–102. doi:10.1111/bcpt.12109.

Scott, D. and Kowalczyk, A. (2007) 'Osteoarthritis of the knee.', *BMJ clinical evidence*, 2007(9), p. 1121.

Sierra-Honigmann, M.R. *et al.* (1998) 'Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor', *Science*, 281(5383), pp. 1683–1686. doi:10.1126/science.281.5383.1683.

Snead, M.P. and Yates, J.R. (1999) 'Clinical and Molecular genetics of Stickler syndrome.', *Journal of medical genetics*, 36(5), pp. 353–9.

Söder, S. *et al.* (2005) 'Antisense inhibition of osteogenic protein 1 disturbs human articular cartilage integrity: Effect of OP-1 Antisense Inhibition on Cartilage', *Arthritis & Rheumatism*, 52(2), pp. 468–478. doi:10.1002/art.20856.

Song, G.G., Kim, J.-H. and Lee, Y.H. (2014) 'A meta-analysis of the relationship between aspartic acid (D)-repeat polymorphisms in asporin and osteoarthritis susceptibility', *Rheumatology International*, 34(6), pp. 785–792. doi:10.1007/s00296-013-2916-8.

Spector, T.D. *et al.* (1996) 'Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study', *BMJ*, 312(7036), pp. 940–943. doi:10.1136/bmj.312.7036.940.

Stecher, R.M. and Hersh, A.H. (1944) 'HEBERDEN'S NODES: THE MECHANISM OF INHERITANCE IN HYPERTROPHIC ARTHRITIS OF THE FINGERS 1', *Journal of Clinical Investigation*, 23(5), pp. 699–704. doi:10.1172/JC1101540.

Steppan, C.M. *et al.* (2000) 'Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice', *Regulatory Peptides*, 92(1–3), pp. 73–78. doi:10.1016/S0167-0115(00)00152-X.

Styrkarsdottir, U. *et al.* (2018) 'Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO , IL11 , COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis'. doi:10.1038/s41588-018-0247-0.

Styrkarsdottir, U. (2019) 'GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures', (2019), pp. 1–13. doi:10.1038/s41467-019-09860-0.

Su, S.-L. *et al.* (2015a) 'Gene-gene interactions between TGF- β /Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis', *BMJ Open*, 5(6), pp. e007931–e007931. doi:10.1136/bmjopen-2015-007931.

Su, S.-L. *et al.* (2015b) 'Gene-gene interactions between TGF- β /Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis', *BMJ Open*, 5(6), pp. e007931–e007931. doi:10.1136/bmjopen-2015-007931.

Subileau, M. *et al.* (2019) 'Bone Morphogenetic Protein 9 Regulates Early Lymphatic-Specified endothelial cell expansion during mouse embryonic stem cell differentiation.', 12. doi:10.1016/j.stemcr.2018.11.024.

Sun, X. *et al.* (2017) 'Leptin-induced migration and angiogenesis in rheumatoid arthritis is mediated by reactive oxygen species', *FEBS Open Bio*, 7(12), pp. 1899–1908. doi:10.1002/2211-5463.12326.

Tegeder, I. and Lötsch, J. (2009) 'Current evidence for a modulation of low back pain by human genetic variants', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), pp. 1605–1619. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00703.x.

Towler, O.W., Shore, E.M. and Kaplan, F.S. (2020) 'Skeletal malformations and developmental arthropathy in individuals who have fibrodysplasia ossificans progressiva', *Bone*, 130, p. 115116. doi:10.1016/j.bone.2019.115116.

Veronese, N. *et al.* (2018) 'Knee Osteoarthritis and Risk of Hypertension: A Longitudinal Cohort Study', *Rejuvenation Research*, 21(1), pp. 15–21. doi:10.1089/rej.2017.1917.

Veronese, N. *et al.* (2019) 'Type 2 diabetes mellitus and osteoarthritis', *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 49(1), pp. 9–19. doi:10.1016/j.semarthrit.2019.01.005.

Villarreal-Ríos, E. *et al.* (2019) 'Costo directo de la atención médica en pacientes con gonartrosis', *Reumatología Clínica*, 15(5), pp. 277–281. doi:10.1016/j.reuma.2017.09.007.

Vina, E.R. and Kwok, C.K. (2018) 'Epidemiology of osteoarthritis: literature update', *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), pp. 160–167. doi:10.1097/BOR.0000000000000479.

Vrezas, I. *et al.* (2010) 'Case–control study of knee osteoarthritis and lifestyle factors considering their interaction with physical workload', *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 83(3), pp. 291–300. doi:10.1007/s00420-009-0486-6.

Wallace, I.J. *et al.* (2017) 'Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), pp. 9332–9336. doi:10.1073/pnas.1703856114.

Wang, J. *et al.* (2017) 'Additional Evidence Supports Association of Common Variants in *COL11A1* with Increased Risk of Hip Osteoarthritis Susceptibility', *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(2), pp. 86–91. doi:10.1089/gtmb.2016.0308.

Wang, J. and Shete, S. (2017) 'Testing Departure from Hardy-Weinberg Proportions', in Elston, R.C. (ed.) *Statistical Human Genetics*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 83–115. doi:10.1007/978-1-4939-7274-6_6.

Wang, T. *et al.* (2016) 'Single Nucleotide Polymorphisms and Osteoarthritis: An Overview and a Meta-Analysis', *Medicine*, 95(7), p. e2811. doi:10.1097/MD.0000000000002811.

Xiao, Z. and Lin, D. (2016) '[RESEARCH PROGRESS OF PATHOLOGY OF ENDOCHONDRAL OSSIFICATION IN OSTEOARTHRITIS].', *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 30(12), pp. 1556–1561. doi:10.7507/1002-1892.20160320.

Xie, Y. *et al.* (2020) 'Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair', *Nature Reviews Rheumatology*, 16(10), pp. 547–564. doi:10.1038/s41584-020-0469-2.

Xu, J. *et al.* (2008) 'Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Alginate Gels', *Tissue Engineering Part A*, 14(5), pp. 667–680. doi:10.1089/tea.2007.0272.

Yan, M. *et al.* (2018) 'The role of leptin in osteoarthritis', *Medicine (United States)*, 97(14). doi:10.1097/MD.00000000000010257.

Yao, Y. *et al.* (2008) 'High-Density Lipoproteins Affect Endothelial BMP-Signaling by Modulating Expression of the Activin-Like Kinase Receptor 1 and 2', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(12), pp. 2266–2274. doi:10.1161/ATVBAHA.108.176958.

Yuan, Q. *et al.* (2014) 'Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15(1), p. 437. doi:10.1186/1471-2474-15-437.

Yucesoy, B. *et al.* (2015) 'Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: A review', *Work*, 50(2), pp. 261–273. doi:10.3233/WOR-131739.

Zhang, P. *et al.* (2015) 'Significance of Increased Leptin Expression in Osteoarthritis Patients', *PLOS ONE*. Edited by E. Villa, 10(4), p. e0123224. doi:10.1371/journal.pone.0123224.

Zhang, R. *et al.* (2015) 'A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand', *Inflammation Research*, 64(6), pp. 405–414. doi:10.1007/s00011-015-0818-9.

Zhang, Y.-H. *et al.* (2009) '[Changes of serum leptin and vascular endothelial growth factor in children with congenital heart disease]', *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 11(10), pp. 802–804.

Zheng, L. *et al.* (2020) 'KLF10 is upregulated in osteoarthritis and inhibits chondrocyte proliferation and migration by upregulating *Acvr1* and suppressing *inhbb* expression', *Acta Histochemica*, 122(3), p. 151528. doi:10.1016/j.acthis.2020.151528.

Zhidkova, N.I., Justice, S.K. and Mayne, R. (1995) 'Alternative mRNA Processing Occurs in the Variable Region of the Pro- α 1(XI) and Pro- α 2(XI) Collagen Chains', *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), pp. 9486–9493. doi:10.1074/jbc.270.16.9486.

ANEXOS

Anexo I: Consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

México, D.F. a de de 20 .

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, informo que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el trabajo de investigación: “Asociación genética e interacción gen-gen entre los polimorfismos de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos”, cuyo responsable es el Dr. Antonio Miranda Duarte y que se realiza en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Previamente, se me ha explicado que existen algunos factores o componentes hereditarios que se transmiten de generación en generación (de padres a hijos) y que podrían aumentar la posibilidad de que aparezca una enfermedad. Estos componentes hereditarios son variaciones que pueden presentarse en nuestro material genético o hereditario, que no causan daño, pero que algunas de estas variaciones se han relacionado con la presencia de algunas enfermedades, como la osteoartritis.

También me explicaron que lo que se quiere saber con esta investigación es conocer si la gente que tiene algunas variaciones en estos factores genéticos tiene más posibilidades de presentar osteoartritis de las rodillas en comparación con la gente que no tiene esas variaciones. Para esto, es necesario reunir un grupo de pacientes con osteoartritis de rodillas y otro grupo de pacientes sin osteoartritis de rodillas, por lo que se tomará una radiografía simple de rodillas de cada paciente del estudio. Luego, se va a tomar una muestra de sangre con una jeringa en la vena del brazo; ya que de la sangre se puede obtener una muestra del material hereditario y allí se puede saber si variación del componente genético está presente o no. Esa toma de muestra es igual a la que se realiza en los laboratorios clínicos y es un procedimiento sencillo que no tiene peligros, si acaso, podría formarse un moretón. La participación será en un solo momento y no requerirá de citas subsecuentes.

Se me comentó también que todo este procedimiento no tiene ningún costo para mí y que no recibiré compensación económica por mi participación, que puedo recibir

orientación con respecto a los resultados de la radiografía y que, aunque el estudio genético no es necesario para hacer un diagnóstico o darme un tratamiento para mi padecimiento, entiendo que con los resultados de ésta investigación se conocerá mejor a la enfermedad y los factores que la desencadenan. También se me explicó que es posible que guarden una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, porque es posible que después estudien otros factores que en este momento no pueden ser analizados.

Asimismo, se me ha explicado que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación, que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio ya que es una participación voluntaria y, que en caso de negarme a participar, la atención que recibo en esta Institución no cambiará.

Además, se me informó que los datos personales que se recaben se mantendrán privados y se me extendió una copia de este consentimiento para referencias en el futuro.

*En casos donde el paciente sea incapaz de tomar decisiones por sí mismo es un representante legal quien da el consentimiento para su participación. El INR se hará responsable de tratar o indemnizar al paciente en caso de sufrir daños directamente causados por la investigación que así lo ameriten.

_____ Nombre del paciente o representante legal	_____ Firma
_____ Testigo 1	_____ Firma
_____ Testigo 2	_____ Firma
_____ Nombre del investigador	_____ Firma

Informes, dudas o aclaraciones: Instituto Nacional de Rehabilitación, Av. México-Xochimilco, Col. Arenal de Gpe. Servicio de Genética, 3er piso de la torre de Investigación. Teléfonos: 59991000 ext's: 19406, 19408 o 19410. Dr. Antonio Miranda Duarte o Dr. Matvey Sosa Arellano.

Anexo II: Documentos y formato de autoevaluación.

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Guía para la Elaboración y Evaluación del Consentimiento Informado

No.	REQUISITO	CUMPLE CON EL REQUISITO		OBSERVACIONES
		SI	NO	
1	Indica que se trata de una investigación médica y anota el nombre de la investigación.	X		
2	Señala la sede donde se realizará la investigación.	X		
3	Señala la justificación y el objetivo de la investigación. Art. 21, fracción I, RLGSMIS	X		
4	Aclara que la participación del sujeto en la investigación es voluntaria.	X		
5	Informa que al NO ser el deseo del sujeto de participar en la investigación, ello no demeritará de ninguna manera en la calidad de atención que reciba en el Instituto Nacional de Rehabilitación.	X		
6	Muestra en forma clara en qué consiste la participación del sujeto de investigación (los procedimientos que vayan a usarse y su propósito, incluyendo la identificación de los procedimientos que son experimentales). Art. 21, fracción II, RLGSMIS	X		
7	Indica el tiempo de duración de la participación del sujeto de investigación.	X		
8	Especifica los beneficios que se ofrecen al sujeto de investigación. Art. 21, fracción IV, RLGSMIS	X		
9	Especifica los posibles riesgos, molestias y/o complicaciones inherentes a los procedimientos propuestos. Art. 21, fracción III, RLGSMIS	X		
10	Incluye la información completa de los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto (tratamiento estándar). Art. 21, fracción V, RLGSMIS	-	-	No aplica ya que no se trata de un estudio experimental
11	Especifica el compromiso con el sujeto de investigación que recibirá información actualizada obtenida durante la investigación, aunque ésta pudiera afectar la voluntad para continuar participando. Art. 21, fracción IX RLGSMIS	-	-	No aplica ya que no se trata de un estudio prospectivo
12	Especifica las situaciones por las cuales podrá suspenderse la inclusión del sujeto de investigación en el estudio.	-	-	No aplica. Nuestro estudio no tiene fase de pre-selección.
13	Indica la disponibilidad, o no, de las compensaciones económicas que recibirá el sujeto de investigación.	X		

14	Hace referencia de quién se responsabiliza de las complicaciones que pudieran presentarse durante el desarrollo de la investigación.	X		
No.	REQUISITO	CUMPLE CON EL REQUISITO		OBSERVACIONES
		SI	NO	
15	Hace mención a la libertad del sujeto de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en la investigación, sin que por ello se creen prejuicios para continuar su cuidado y tratamiento en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Art. 21, fracción VII, RLGSMIS	X		
16	Informa al sujeto de investigación acerca del proceso para la obtención del Consentimiento Informado.	X		
17	Hace mención a la seguridad de que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad. Art. 21, fracción VIII, RLGSMIS	X		
18	Precisa la forma de obtención del Consentimiento Informado en el caso de pacientes menores de edad (Asentimiento), o bien de incapaces legales para tomar la decisión de participar en el estudio.	X		
19	Especifica la garantía de que el sujeto de investigación recibirá respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto. Art. 21, fracción VI, RLGSMIS	X		
20	Especifica la disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho por parte del INR, en el caso de sufrir daños que lo ameriten, directamente causados por la investigación. Art. 21, fracción X, RLGSMIS	X		
21	Especifica que si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación. Art. 21, fracción XI, RLGSMIS	X		
22	Se identifica el nombre y firma del sujeto de investigación o de su representante legal. Art. 22, fracción IV, RLGSMIS	X		
24	Indica los nombres, direcciones y firma de al menos dos testigos, y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación. Art. 22, fracciones III y IV, RLGSMIS	X		
25	Incluye nombres teléfonos y ubicación de los contactos -adicionales al investigador principal- a los que el sujeto de investigación podrá solicitar información.	X		
26	Especifica que el documento de Consentimiento Informado se extiende por duplicado y que un ejemplar se le entrega al sujeto de la investigación. Art. 22, fracción V RLGSMIS	X		
27	La redacción es clara y completa, y emplea un lenguaje sencillo y no confuso para el sujeto de investigación, de tal forma que pueda comprenderla. Art. 21, RLGSMIS	X		

Anexo III: Formato de recolección de datos.

Instituto Nacional de Rehabilitación

Servicio de Genética

“Asociación genética e interacción gen-gen entre los polimorfismos de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos”

Ca: ____

No: ____:____:____:____:

Co: ____

No expediente: ____:____:____:____:____:____:

Fecha :____:____:____:____:____:____:

día mes año

Nombre: _____

—

Tel. _____ Dom. _____

—

Sexo: ____: Masc ____: Fem Edad :____:____: Fecha de nacimiento :____:____:____:____:____:____:

día mes año

Lugar _____ de _____ Origen: _____

Estado civil: Soltero :____: Casado:____: Divorciado :____: Viudo :____: U.L. :____:

Clasificación socioeconómica :____ ____: (nivel asignado por Trabajo Social del CNR)

Tabaquismo si :____: no :____: Desde cuándo: _____

No. Cigarros al día: _____

Alcoholismo si :____: no :____: Desde cuándo: _____

Intensidad: _____

Menopausia si :____: no :____: (ausencia de menstruación por 12 meses consecutivos)

Especificar tiempo: _____

Escolaridad

Sin estudios :____:

Primaria completa :____: Primaria incompleta :____:

Secundaria completa :____: Secundaria incompleta :____:

Preparatoria completa :____: Preparatoria incompleta :____:

Est. Superiores compl. :____: Est. Superiores incomp. :____:

Especificar estudios superiores: _____

Otros estudios compl. :__: Otros estudios incomp. :__:

Especificar otros estudios: _____

Ocupación

Ocupación actual: _____

Desde cuando: :__: (año)

Ocupación anterior: _____

Desde cuando: :__: (año) Hasta cuando: :__: (año)

Ocupación anterior: _____

Desde cuando: :__: (año) Hasta cuando: :__: (año)

Traumatismos

Traumatismos frecuentes en rodilla si :__: no :__:

Accidentes previos con daño en rodilla si :__: no :__:

Especificar: _____

Tratamiento empleado para los casos anteriores si :__: no :__:

Especificar: _____

Actividad deportiva

Deporte actual si :__: no :__: Especificar: _____

Inicio :__: Regular :__: Irregular :__: Veces a la semana 1:__: 2:__: 3:__: 4:__: 5:__: 6:__: 7:__:

(año)

Deporte anterior si :__: no :__:

Especificar: _____

Inicio :__: (año) Suspensión :__: (año)

Regular :__: Irregular :__: Veces a la semana 1:__: 2:__: 3:__: 4:__: 5:__: 6:__: 7:__:

Antecedentes heredo-familiares

	1 ^{er} grado	2 ^o grado	3 ^{er} grado
	(Padres, Hermanos, Hijos)	(Abuelos,	Tíos, Nietos,
Sobrinos)	(Primos hermanos)		

Dx. de Osteoartritis	:_:	:_:	:_:
Especificar familiar	:_____:	:_____:	
:_____:			
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	
:_____:			
Especificar familiar	:_____:	:_____:	
:_____:			
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	
:_____:			
Especificar familiar	:_____:	:_____:	
:_____:			
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	
:_____:			
Hipertensión arterial	:_:	:_:	:_:
Cardiopatía	:_:	:_:	:_:
Diabetes mellitus 2	:_:	:_:	:_:
Cáncer	:_:	:_:	:_:
Especificar cáncer_____			
Otro antecedente	:_:	:_:	:_:
Especificar_____			
Otro antecedente	:_:	:_:	:_:
Especificar_____			
Otro antecedente	:_:	:_:	:_:
Especificar_____			

Enfermedades concomitantes

Tratamiento y duración

Diabetes mellitus 2	si :_:	no :_:
:_____:		
Hipertensión arterial	si :_:	no :_:
:_____:		
Cardiopatía	si :_:	no :_:
:_____:		
Cáncer:_____	si :_:	no :_:
:_____:		

Hipercolesterolemia: si :__: no :__:

:_____:

Otra:_____ si :__: no :__:

:_____:

Otra:_____ si :__: no :__:

:_____:

Información importante, no omitir

Talla :__:__: cm Peso :__:__ (Kg.) :__:__ (gr.) IMC (kg/m²) :_____:

Evaluación clínica en osteoartritis

Fecha de inicio de la osteoartritis :__:__ :__:__ :__:__:

(Primera manifestación atribuible a la enfermedad) día mes año

Fecha de diagnóstico :__:__ :__:__ :__:__:

día mes año

Síntomas

Edad :_____: si :__: no :__:

Dolor de RD y/o RI al movimiento si :__: no :__:

Dolor de RD y/o RI al movimiento y reposo si :__: no :__:

Sensación de "inestabilidad" si :__: no :__:

RAM en minutos _____ si :__: no :__:

Signos

Alteraciones en alineación si :__: no :__:

 Geno valgo si :__: no :__:

 Geno varo si :__: no :__:

Crecimiento óseo si :__: no :__:

Laxitud ligamentaria **si** :__: no :__:

Dolor a la presión ósea si :__: no :__:

Crepitación si :__: no :__:

Derrame articular si :__: no :__:

Limitación del movimiento si :__: no :__:

Calor no palpable si :__: no :__:

Otros

datos:_____

Observaciones:_____

Elaboró:_____

Anexo IV: Formato de evaluación radiológica.

Instituto Nacional de Rehabilitación

Servicio de Genética

“Asociación genética e interacción gen-gen entre los polimorfismos de *LEP*, *VEGF*, *COL11A1* y *ACVR1* con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos”

Nombre _____ del _____ paciente:

Datos radiológicos de osteoartritis:

Sin datos radiológicos: __:

Osteofitos:

:__: Osteofitos posibles en los bordes

:__: Osteofitos definitivos

:__: Osteofitos múltiples moderados

:__: Grandes osteofitos

Espacio articular:

:__: Disminución dudosa del espacio articular

:__: Disminución posible del espacio articular

:__: Disminución definitiva del espacio articular

:__: Disminución acentuada del espacio articular

Esclerosis:

:__: Cierta esclerosis

:__: Esclerosis intensa

Deformación ósea terminal:

:__: Deformación ósea terminal posible

:__: Deformación ósea terminal definitiva

Grado radiológico: 0(ausente):__: 1(dudosa):__: 2(leve):__: 3(moderada):__: 4(severa):__:

Observaciones: _____

Evaluador: _____ Fecha: _____

