



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD IZTAPALAPA

**INTERACTOMA DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO DE
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA-1 α EN
PACIENTES MEXICANOS CON OSTEOARTRITIS DE RODILLA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

P R E S E N T A:

M. en C. JAVIER FERNÁNDEZ TORRES

Comité Tutorial:

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

CO-DIRECTORA: DRA. GABRIELA ANGÉLICA MARTÍNEZ NAVA

ASESOR: DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ

CIUDAD DE MÉXICO,

A 05 DE SEPTIEMBRE DE 2019

Ciudad de México, Septiembre 2019

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz y el asesoramiento del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz; y en el Laboratorio de Líquido Sinovial del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” de la Secretaría de Salud, bajo la co-dirección de la Dra. Angélica Gabriela Martínez Nava. Los ensayos de genotipificación se realizaron en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la supervisión de la Dra. Daniela Garrido Rodríguez.

El programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El trabajo contó con la aprobación del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” con número de registro 18/13.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

CO-DIRECTORA

Dra. Gabriela Angélica Martínez Nava
Laboratorio de Líquido Sinovial
Dirección de Investigación
Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”
ameria.justice@gmail.com

ASESOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: “Interactoma de los polimorfismos de un solo nucleótido de la vía de señalización del factor inducible de hipoxia-1 α en pacientes mexicanos con osteoartritis de rodilla” que presentó:

Javier Fernández Torres

el día 05 de Septiembre del año 2019

H. Jurado:

Presidente:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz



Secretario:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz



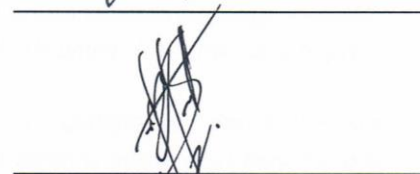
Vocal:

Dra. Gabriela Angélica Martínez Nava



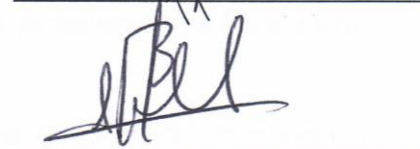
Vocal:

Dr. Óscar Hernández Hernández



Vocal:

Dr. Alberto Hidalgo Bravo



Agradecimientos

Gran parte del espacio dedicado a la realización de este trabajo se lo debo, sin lugar a dudas, a mi familia; espero que me alcance el tiempo para reponérselo con mucho amor y gratitud. El amor, el cariño y la comprensión de mi esposa Denhi y de mis hijos Matteo y Galia, son infinitos; siempre habrá momentos para decir TACNYCAN.

Sean cuales sean las virtudes de este trabajo de investigación se deben en gran parte a mi grupo de trabajo encabezado por mujeres científicas, y que gracias a sus indiscutibles contribuciones, comentarios críticos y estimulantes contrastes de opiniones, lo hicieron posible. Me encuentro en deuda infinita con las Doctoras Yessica Zamudio Cuevas, Karina Martínez Flores, y particularmente con mi codirectora de tesis Gabriela Martínez Nava. También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Alberto López Reyes por la idea de llevar a cabo este trabajo de investigación, el cual fue la continuación de mi maestría.

Me siento profundamente agradecido con mi directora y asesor de tesis, la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz y el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, por el tiempo que dedicaron a mi formación, a la revisión de documentos, asistencia a las evaluaciones, y sus comentarios críticos a las presentaciones y manuscritos. No omito mencionar que sin haberme conocido desde un principio, depositaron toda su confianza en mi persona. Espero no haberles fallado. Asimismo, extiendo mi agradecimiento a los Doctores Oscar Hernández Hernández y Alberto Hidalgo Bravo por haber aceptado ser parte de mi jurado y hacer un revisión crítica de mi trabajo de tesis.

Siempre me sentiré estimulado y seguro con mi amada familia; gracias por las reuniones de los sábados, sin ellas no tendría sentido mi vida. Agradezco todo el amor y apoyo de mi madre (Tita), de mis hermanos Tito, Pipe, Tity y Toty, y de mis sobrinos Santiago, Nicolás, Andrea y Emiliano, todos ellos son mi más grande ejemplo de unión. Los amo por siempre.

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por facilitarme sus instalaciones y permitirme formar parte de ella. Todo mi agradecimiento a su personal que siempre me atendió con mucha generosidad y hospitalidad, particularmente a Patricia Cruz, asistente de la Coordinación Académica.

El Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, lo considero mi segundo hogar, por lo que no tengo suficientes palabras para expresar mi agradecimiento por abrirme siempre sus puertas.

Deseo también dar las gracias a todos los participantes internos y externos (particularmente a los pacientes), y a los alumnos que brindaron su apoyo, especialmente a Adriana Francisco por auxiliarme en el procesamiento de los chips.

“....no se han dado casos, pienso yo, en los que una lesión del cartílago se haya reparado, o que una porción perdida se restaure con un nuevo y correctamente formado cartílago articular en los humanos....”

Paget J. Healing of injuries in various tissues. *Lect Surg Pathol* **1853**;1:262-274.

A mis hijos Matteo y Galia

Les deseo un mundo lleno de interacción con la ciencia

INDICE

	Página
Índice de figuras	1
Índice de tablas y gráficas	2
Lista de abreviaturas	3
1. Resumen	5
1.1 <i>Abstract</i>	7
2. Introducción	8
2.1 Definición, epidemiología y clasificación de la osteoartritis	8
2.2 Cartílago articular	10
2.3 Factor Inducible de Hipoxia-1 α (HIF-1 α)	13
2.4 Polimorfismos genéticos	17
2.5 Polimorfismos genéticos en el sistema HIF-1 α	19
3. Pregunta de investigación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	22
5.1 Objetivos específicos	22
6. Material y Métodos	23
6.1 Tamaño de la muestra	23
6.2 Muestreo	24
6.3 Grupos de estudio	24
6.3.1 Criterios de inclusión	24
6.3.2 Criterios de exclusión	25
6.3.3 Criterios de eliminación	25
6.3.4 Operacionalización de variables	26
6.4 Desarrollo metodológico	26
6.4.1 Obtención de muestras biológicas	26
6.4.2 Extracción de ADN	27
6.4.3 Selección de polimorfismos para el arreglo de baja densidad	27

6.4.4 Diagrama de flujo operacional (Fig. 11)	31
6.4.5 Análisis estadístico	31
7. Resultados	33
8. Discusión	52
9. Conclusiones	60
10. Referencias	62
11. Cronograma de actividades	73
12. Artículo original publicado	74
13. Artículo de revisión publicado	74

INDICE DE FIGURAS

		Página
1	Escala radiológica de Kellgren-Lawrence y grado de OA	9
2	Pérdida del cartílago articular y presencia de osteofitos	9
3	Histología del cartílago articular normal y artrósico	11
4	Composición de la matriz extracelular del cartílago articular	12
5	Estructura de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β	14
6	Actividad de HIF-1 α bajo condiciones de normoxia	15
7	Actividad de HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia	16
8	Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	18
9	Localización del gen <i>HIF1A</i> en el cromosoma 14	21
10	Arreglo de baja densidad OpenArray	30
11	Diagrama de flujo operacional	31
12	Principales componentes ancestrales de las poblaciones analizadas	42
13	Epistasis de SNPs de vía de HIF-1 α	50
14	Genotipos de alto y bajo riesgo en el desarrollo de OA	51
15	Efecto sinérgico y antagónico de los genotipos y alelos de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes con OA de rodilla	61

INDICE DE TABLAS y GRÁFICAS

Tablas		Página
1	Operacionalización de variables	26
2	Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) estudiados	28
3	Características de la población de estudio	34
4	Distribución de los SNPs de la vía de señalización de HIF-1 α en casos de OA y controles (valores de OR crudos)	35
5	Distribución del MAF en casos de OA y controles	41
6	Asociación de polimorfismos de la vía de señalización de HIF-1 α en casos de OA y controles	43
7	Asociación de polimorfismos estratificados por género	44
8	Asociación de polimorfismos divididos por grupos de edad	46
9	Haplotipos de polimorfismos con valor de p significativa	48
10	Resultados del análisis MDR	49

Gráficas		Página
1	Suma de efectos mínimos de polimorfismos con valor de p significativa	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	Colegio Americano de Reumatología
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGER	Receptor de los productos de glicosilación avanzada (gen)
AIMs	Marcadores informativos de ancestría
AKT2	AKT Familia de Serina/Treonina cinasas 2 (gen)
CA	Anhidrasa carbónica (gen)
CKM	Creatin-cinasa tipo M (gen)
COL2A1	Colágena tipo 2 subunidad alfa (gen)
COL3A1	Colágena tipo 3 subunidad alfa (gen)
EDN1	Endotelina 1 (gen)
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (gen)
EGLN1 (PDH)	Prolil Hidroxilasa (PDH) codificada por el gen EGLN1
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EPO	Eritropoyetina (gen)
FIH-1 (HIF1AN)	Factor inhibidor de HIF-1 (gen)
GSK3B	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta (gen)
HIF-1 α	Factor inducible de hipoxia-1 subunidad alfa (proteína)
HIF-1 β	Factor inducible de hipoxia-1 subunidad beta (proteína)
HIF1A	Factor inducible de hipoxia-1 subunidad alfa (gen)
IGF1	Factor de crecimiento tipo insulina (gen)
IMC	Índice de masa corporal
IL6	Interleucina 6 (gen)
KDa	Kilo Daltones

K-L	Escala radiológica de Kellgren y Lawrence
LD	Desequilibrio de ligamiento, se representa con la letra δ'
MAF	Frecuencia del alelo menor
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MDR	Reducción de dimensionalidad multifactorial
MMP3	Metaloproteinasa de matriz 3 (gen)
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13 (gen)
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2 (gen)
NOS3	Óxido nítrico sintasa 3 (gen)
OA	Osteoartritis
OR (RM)	Odds Ratio (Razón de momios en español)
PIB	Producto interno bruto
PIK3R1	Subunidad alfa de la fosfatidil inositol 3-cinasa (gen)
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
VEGFA	Factor de crecimiento del endotelio vascular A (gen)
VHL	Von Hippel Lindau (gen)

1. RESUMEN

Antecedentes. La osteoartritis (OA) es un desorden reumático crónico-degenerativo en el que se ven afectadas las articulaciones debido al desgaste cartilaginoso; esto provoca disminución en el espacio articular, y por ende fricción entre los huesos lo que genera dolor crónico y discapacidad. Su patogenia es compleja, y en ella se ven involucrados factores genéticos, mecánicos (sobrepeso), de género (mujeres principalmente), edad (adultos mayores), etc., lo que hace difícil su comprensión.

El gen *HIF1A* codifica para el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α), que es una proteína reguladora de la homeostasis del oxígeno en diversos tejidos. El cartílago articular es un tejido con baja tensión de oxígeno (hipóxico), y la participación de HIF-1 α en este tejido es fundamental para regular su metabolismo. La activación de HIF-1 α está mediada por la hipoxia y algún estímulo externo, como un factor de crecimiento o una interleucina; a partir de ahí, se lleva a cabo una cascada de eventos donde diversas proteínas interactúan para inducir la expresión de genes que regulan la homeostasis del cartílago articular.

La expresión de HIF-1 α y las proteínas asociadas a su vía de señalización, puede verse afectada por la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), por lo que el objetivo de este trabajo es investigar si la interacción de los SNPs de la vía de señalización de HIF-1 α están implicados en el desarrollo de la osteoartritis de rodilla (OA).

Material y métodos. Un total de 401 individuos mestizos Mexicanos no

relacionados (134 pacientes con artrosis de rodilla y 267 controles sanos) fueron reclutados para el estudio. Cuarenta y dos SNPs de 22 genes implicados en la vía de señalización HIF-1 α (*PIK3R1*, *AKT2*, *GSK3B*, *IL6*, *AGER*, *HIF1A*, *EGLN1*, *VHL*, *HIF1AN*, *VEGFA*, *EPO*, *NOS2*, *NOS3*, *IGF1*, *EGF*, *EDN1*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP13*, *CA*, *COL2A1* y *COL3A1*) se genotipificaron mediante ensayos de discriminación alélica utilizando el sistema OpenArray. Para este estudio, se hizo un análisis de la distribución de las frecuencias génicas y alélicas, la suma de efectos mínimos de los alelos de protección y de riesgo, haplotipos, e interacciones gen-gen (epistasias). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico STATA v14. Las epistasias se analizó mediante el método de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR).

Resultados. El análisis mediante MDR mostró epistasias entre los polimorfismos rs8100018 (*AKT2*) y rs2288377 (*IGF1*); rs8100018 (*AKT2*) y rs35767 (*IGF1*); rs35767 (*IGF1*) y rs1793953 (*COL2A1*); y entre el rs6438552 (*GSK3B*) y rs35767 (*IGF1*), con valores de información de ganancia de 21.24%, 8.37%, 9.93% y 5.73%, respectivamente. Además, nuestro modelo nos permitió identificar genotipos de alto y bajo riesgo entre los polimorfismos rs1793953 (*COL2A1*), rs6438552 (*GSK3B*), rs8100018 (*AKT2*) y rs35767 (*IGF1*).

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de HIF-1 α participa en el desarrollo de OA de rodilla. Conocer las interacciones de estos polimorfismos implicados en esta vía podría proporcionar una nueva herramienta para identificar a personas con alto riesgo de desarrollar OA de rodilla.

1.1 Abstract

Introduction. Articular cartilage is the target tissue of osteoarthritis (OA), and because it lacks capillary networks, the micro-environment is hypoxic. Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) regulates the homeostasis of this tissue.

Objectives. The aim of this study was investigate whether genetic polymorphisms of the HIF-1 α signaling pathway are involved in the development of knee OA.

Method. We performed a case-control association study and genotyped one hundred thirty-four knee OA patients and two hundred sixty-seven healthy controls. All participants were genotyped in order to evaluate forty-two SNPs from twenty-two genes involved in the HIF-1 α signaling pathway using the OpenArray technology. Gene-gene interactions (epistasis) were analyzed using the multifactor dimensionality reduction (MDR) method.

Results. The MDR analysis showed epistasis between AKT2 (rs8100018) and IGF1 (rs2288377), AKT2 (rs8100018) and IGF1 (rs35767), IGF1 (rs35767) and COL2A1 (rs1793953), and between GSK3B (rs6438552) and IGF1 (rs35767) polymorphisms, with information gain values of 21.24%, 8.37%, 9.93%, and 5.73%, respectively. Additionally, our model allowed us to identify high- and low-risk genotypes among COL2A1 rs1793953, GSK3B rs6438552, AKT2 rs8100018 and IGF1 rs35767 polymorphisms.

Conclusions. Knowing the interactions of these polymorphisms involved in HIF-1 α signaling pathway could provide a new diagnostic support tool to identify individuals at high risk of developing knee OA.

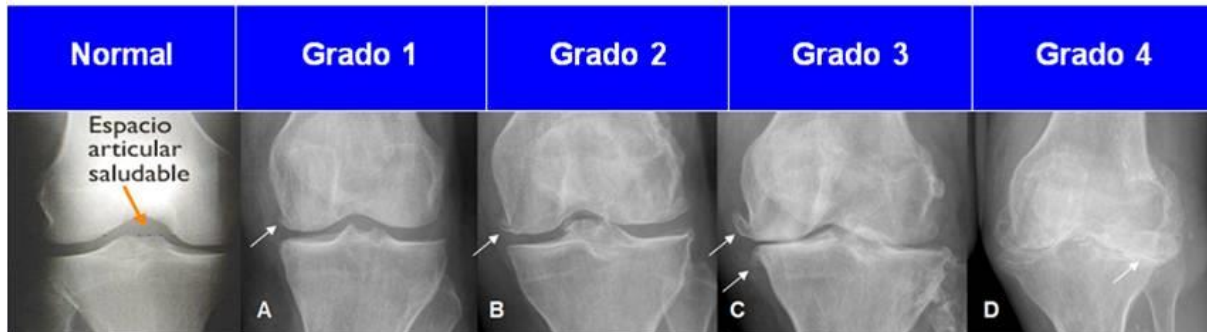
2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición, epidemiología y clasificación de la Osteoartritis

La osteoartritis (OA) o artrosis, es la más común de las enfermedades articulares, y en recientes años se ha convertido en un problema grave de salud pública [1]. Se posiciona como una de las principales enfermedades causantes de discapacidad física y se manifiesta por dolor crónico, hinchazón, crepitación, deformidad e incapacidad funcional principalmente de las articulaciones de gran movilidad o que soportan peso como las rodillas; además, este proceso conlleva a la neoformación de excrecencias óseas conocidas como osteofitos, e inflamación de la membrana sinovial. La padece al menos el 15 % de la población a nivel mundial por arriba de los 60 años de edad [2-10]. En México, dentro de las primeras diez causas de consulta está el dolor articular, y la OA es la primera causa de consulta reumatológica [11]; se calcula que en nuestro país se destina el 0.4% del PIB en atención a enfermedades músculo-esqueléticas [12].

El Colegio Americano de Reumatología (ACR, *por sus siglas en inglés*) se basa en criterios clínicos y radiológicos para diagnosticar y clasificar la OA. Los criterios clínicos incluyen grado de dolor y presencia de nódulos, los cuales pueden causar deformación y por ende, afectar la movilidad de la articulación; los criterios radiológicos, identifican alteraciones óseas y/o la presencia de osteofitos [13-16] (**Figuras 1 y 2**). La OA se clasifica en primaria (o idiopática), y

en secundaria (donde la causa se puede identificar) que incluye factores metabólicos, anatómicos, de trauma e inflamatorios [14, 16].



Grado	Descripción
0	Ausencia de osteofitos
1	Osteofitos dudosos
2	Osteofitos mínimos, posible disminución del espacio articular, quistes y esclerosis
3	Osteofitos moderados o claros, con pinzamiento moderado de interlínea
4	Grandes osteofitos y claro pinzamiento de la interlínea

Figura 1. Escala radiológica de Kellgren y Lawrence para clasificar la OA. Las flechas indican la presencia de osteofitos. En el cuadro D puede observarse la pérdida total del espacio articular.

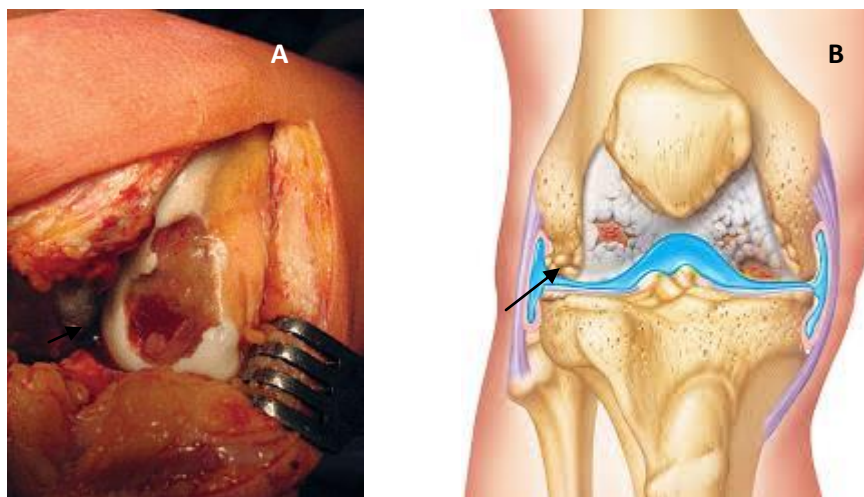


Figura 2. Pérdida del cartílago articular (A), y presencia de osteofitos (B)

2.2 Cartílago articular

La marca de la OA es la destrucción del cartílago articular hialino con compromiso local del hueso subcondral y membrana sinovial, generando cambios irreversibles en estos tejidos los cuales están mediados por las células presentes: condrocitos, células del linaje de osteoblastos, y sinoviocitos, respectivamente, cuyas actividades principales son mantener la integridad y la función de la articulación [17, 18].

El cartílago articular es un tejido conectivo viscoelástico que carece de redes capilares en todos los sentidos; es decir, es avascular, aneural y alinfático. Funciona hidrodinámicamente para soportar y distribuir la carga, además de proporcionar un movimiento casi libre de fricciones en las articulaciones [19]. Su composición consiste de una matriz extracelular (MEC) constituida por agua (60 – 80%) y una mezcla de moléculas (15%) de sostén, principalmente colágena, proteoglicanos, glicoproteínas y lípidos; además contiene condrocitos (~4%), únicas células presentes [20]. Recibe sus nutrientes y oxígeno por difusión a partir del flujo dinámico del líquido sinovial y hueso subcondral. En la **Figura 3** se muestra la estructura de un cartílago articular sano, y en **Figura 4** otro con artrosis, ambos teñidos hematoxilina-eosina.

Debido a la avascularidad del cartílago, la viabilidad de los condrocitos se ve comprometida por varios fenómenos tales como estrés oxidativo, mediadores inflamatorios y condiciones hipóxicas. La hipoxia es un estado donde el aporte y

consumo de oxígeno está por debajo del nivel necesario para mantener la tensión de oxígeno fisiológica en algún tejido en particular [22].

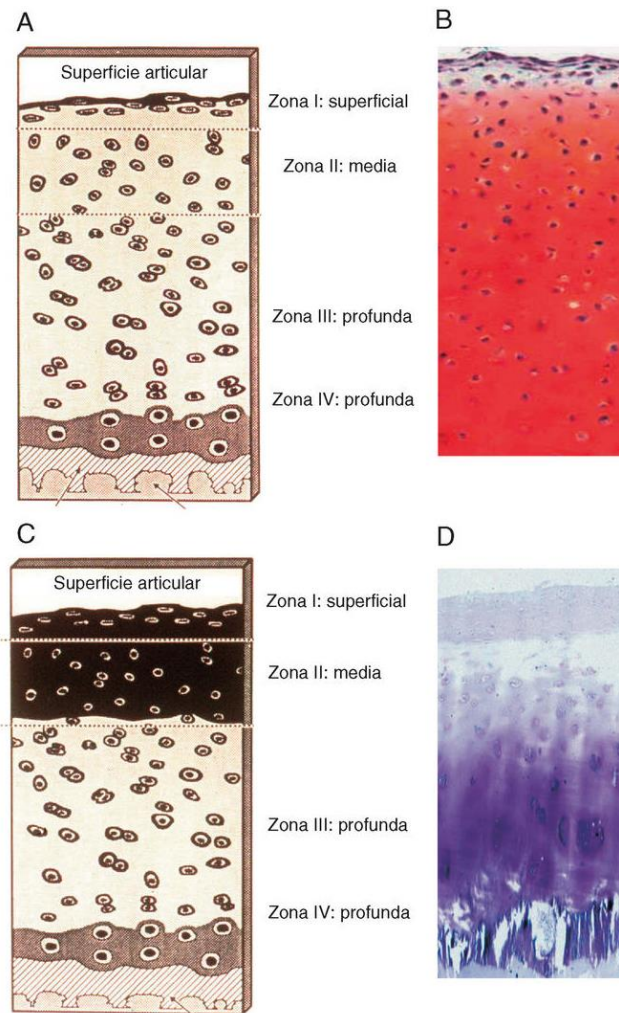


Figura 3. Histología del cartílago articular normal y artrósico. Paneles A y B: en la capa superficial o zona I, los condrocitos son algo más pequeños y aplanados, están situados de forma paralela a la superficie articular. En la zona media o zona II, que representa entre el 60-40% de todo el cartílago, los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en grupos. En la zona III o profunda, los condrocitos son más elípticos, forman columnas y se orientan perpendicularmente a la superficie. En la zona IV o calcificada, los condrocitos están más esparcidos. Los paneles C y D muestran los cambios típicos del cartílago artrósico, se produce un descenso en el contenido de la matriz extracelular y del número de condrocitos, principalmente en las capas I y II. Esta hipocelularidad se ocasiona por un incremento en la apoptosis de los condrocitos artrósicos [Ref. 21].

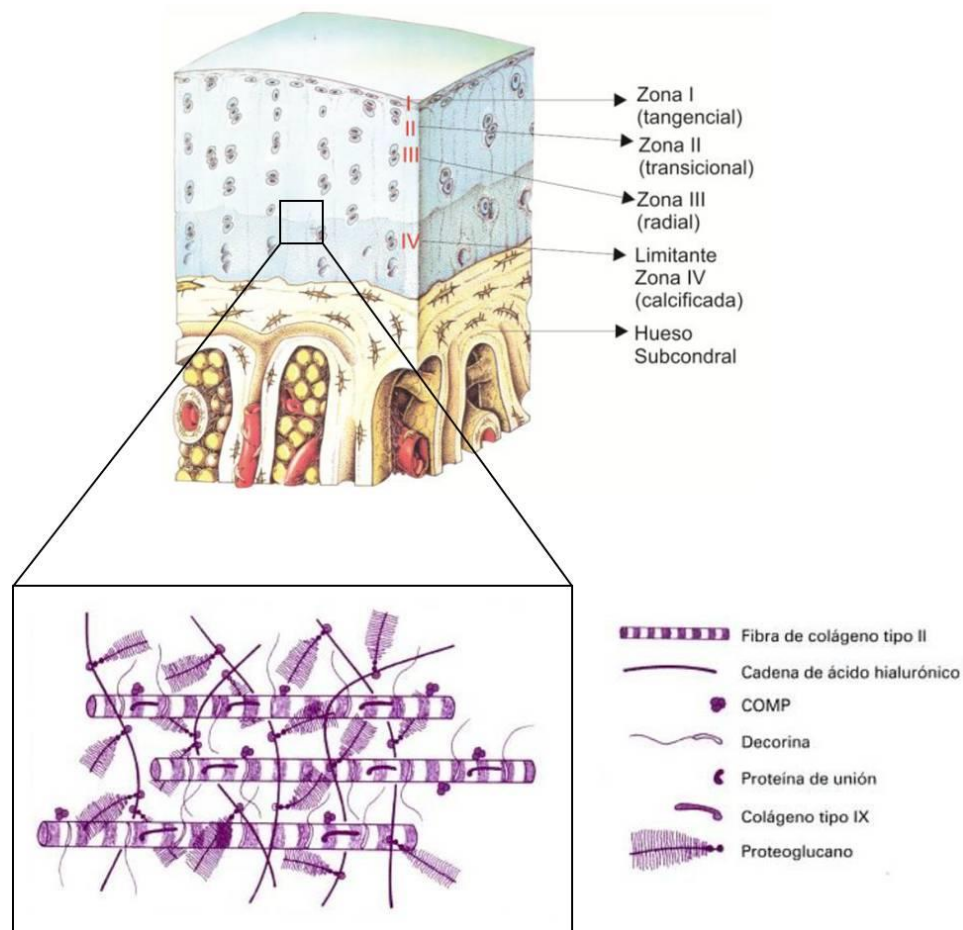


Figura 4. Matriz extracelular del cartílago articular. La MEC del cartílago está compuesta principalmente por agua, fibras de colágena tipo II y proteoglicanos; además, hay otras moléculas de sostén como el ácido hialurónico y colágena tipo IX, las cuales que brindan rigidez.

Se ha determinado que, bajo condiciones de hipoxia, la concentración de oxígeno en el cartílago articular varía del 0.5% al 10% (~4 a 70 mm Hg, respectivamente) dependiendo de la zona [23, 24]; así, a través de mecanismos bien conservados, los condrocitos pueden realizar sus funciones metabólicas bajo tales condiciones. Quizás el principal mecanismo de adaptación a la hipoxia se deba a la expresión del factor inducible de hipoxia-1 alfa (HIF-1 α) [25]. Cuando el HIF-1 α se activa, comienza una cascada de eventos intracelulares con el fin de mantener condiciones fisiológicamente homeostáticas.

2.3 Factor Inducible de Hipoxia-1 alfa (HIF-1 α)

El factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1) es un heterodímero compuesto por dos subunidades: la subunidad α (HIF-1 α) que es inducible por el oxígeno; y la subunidad β (HIF-1 β), que es constitutiva y es estable con el oxígeno a la cual también se le conoce como traslocador nuclear del receptor de aril-hidrocarburos (ARNT) [26]. Tanto HIF-1 α y HIF-1 β pertenecen a la familia de factores de transcripción dispuestos en doble hélice, -hélice-bucle-hélice básico- (bHLH). Hay dos puntos locales de señalización nuclear (NLS), pero sólo el que se encuentra hacia el C-terminal es el responsable de la acumulación de HIF-1 α en el núcleo. En la región N-terminal, se localiza el dominio compuesto por bHLH y PER-ARNT-SIM A (PAS A), necesario para la dimerización y unión al ADN a través de los elementos de respuesta a la hipoxia (HER) [27]. La **Figura 5** ilustra la estructura de las subunidades HIF-1 α y HIF1- β .

En 1995, Wang y Semenza purificaron y caracterizaron una proteína de 120 KDa, la cual fue subsecuentemente nombrada como factor inducible de hipoxia-1 α [28]. HIF-1 α es un polipéptido de 826 aminoácidos y es codificado por el gen *HIF1A*, localizado en el cromosoma 14q21-24; juega un papel crítico en la homeostasis del oxígeno en diversos tipos celulares tales como los condrocitos [29, 30].

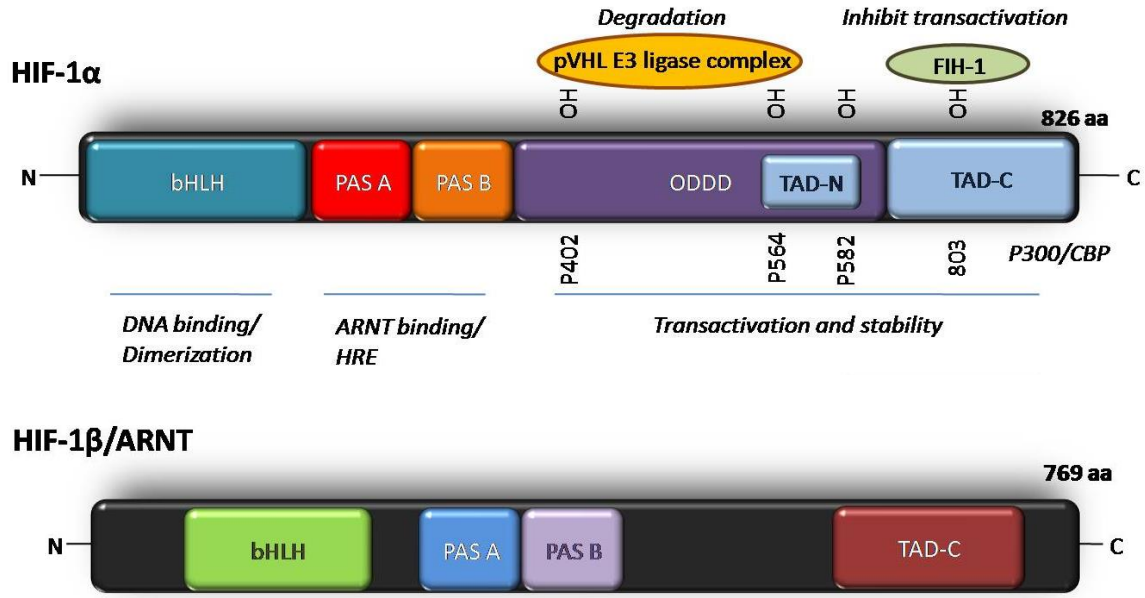


Figura 5. Estructura de las subunidades HIF-1α y HIF-1β.

HIF-1α es el principal factor de transcripción que actúa como un regulador fisiológico. En condiciones de normoxia, HIF-1α es hidroxilado en dos residuos de prolina en las posiciones Pro402/564, dentro del dominio dependiente de la degradación del oxígeno (ODD, *por sus siglas en inglés*). Esta hidroxilación clave se lleva a cabo por prolil-hidroxilasas (PHDs), que son dioxigenasas dependientes de oxoglutarato, oxígeno y Fe^{2+} , y que permiten el reconocimiento de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), la cual es el sustrato de reconocimiento del complejo ubiquitina ligasa E3 para que HIF-1α sea degradado por el proteosoma [26, 29-31]. En este sentido, el dominio ODD se considera como un verdadero sensor de oxígeno. Otro sensor de oxígeno que forma parte de HIF-1α, es el factor de inhibición de HIF-1α (FIH-1; su gen *HIF1AN*), que en presencia de oxígeno, hidroxila a la asparagina en la posición

803 dentro del dominio de activación transcripcional del C-terminal (C-TAD). En la **Figura 6** se muestra la actividad de HIF-1 α bajo condiciones de normales de oxígeno.

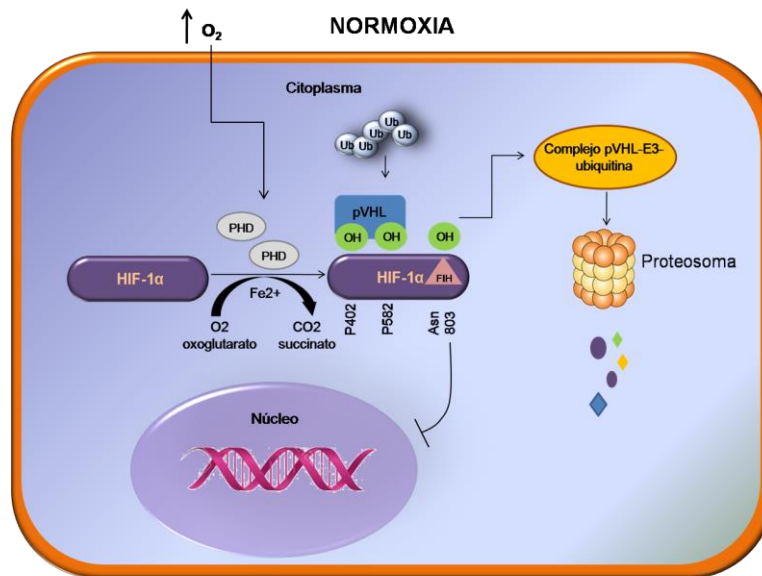


Figura 6. Actividad de HIF-1 α bajo condiciones de normoxia. Bajo estas condiciones, HIF-1 α se hidroxila en el ODD por medio de PHDs, para formar un complejo con el factor de von Hippel-Lindau (VHL); este complejo se une a Ub para ser degradado en el proteosoma.

Sin embargo, bajo condiciones reducidas de oxígeno (hipoxia), la actividad de las PHDs se ve disminuida, lo que evita la hidroxilación de HIF-1 α y por ende su degradación. En estas condiciones, la concentración HIF-1 α en el citoplasma va incrementando lo que favorece su fosforilación por MAPK; posteriormente se trasloca al núcleo para unirse con la subunidad HIF-1 β y formar el complejo [HIF-1 α / HIF-1 β]. Este complejo se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) presentes en regiones 5'TAGCGTGH3' del ADN para dar inicio a la expresión de diversos genes, tales como *NOS2*, *VEGF*, *EPO*, *GLUT1*, *SOX9*,

IGF2, *COL2A1*, entre muchos otros (**Figura 7**) [23, 32, 33]. La transcripción de estos genes blanco actúan para mantener las funciones protectoras del cartílago que suceden en el ambiente articular durante la OA [34, 35]. Además, C-TAD permanece inactivo, lo que permite su interacción con los coactivadores de proteína de unión CREB y p300 (CBP/p300). Cabe mencionar que la inhibición o depleción de la glucógeno sintasa 3 (GSK-3) incrementa la expresión de HIF-1 α , mientras que la sobreexpresión de la subunidad GSK-3 β reduce su expresión [36].

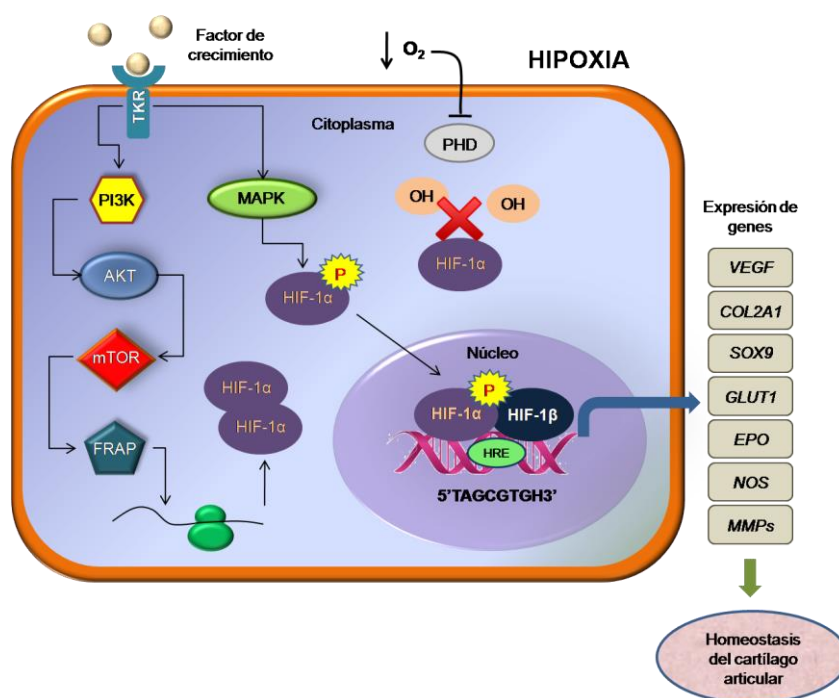


Figura 7. Actividad de HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia. En condiciones de hipoxia, la actividad de la PHD disminuye, lo que origina que HIF-1 α se acumule en el citoplasma. De esta manera, MAPK fosforila a HIF-1 α y se trasloca al núcleo para unirse con HIF-1 β . Una vez en el núcleo, el complejo [HIF-1 α / HIF-1 β] se une, a través de los HREs, a secuencias 5'TAGCGTGH3' presentes en regiones promotoras de genes. Algunos de esos genes blanco son *NOS2* y *NOS3*, que actúan como vasodilatadores; *VEGF* como angiogénico, remodelación y al mismo tiempo, inductor de HIF-1 α ; *EPO* como inductor de la eritropoyesis, *COL2A1*, *SOX9* y *MMPs* participan en la remodelación del cartílago.

2.4 Polimorfismos genéticos

Un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Aquellos polimorfismos que afectan la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos [37-39]. Un polimorfismo genético puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada (polimorfismo de un solo nucleótido, SNP *por sus siglas en inglés*), por ejemplo la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina) (**Figura 8**). O bien, puede ser más complicado; por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de ADN donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de una determinada secuencia. Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN no se llaman polimorfismos, sino más bien mutaciones [40-42]. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer en al menos el 1% de la población. Los principales tipos de polimorfismos son los siguientes:

- Polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*).
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- Polimorfismos en el número de repetición en tandem (VNTR, del inglés *Variable Number Tandem Repetition*).

Los SNPs son formas alternativas del genoma humano y no cambian mucho de una generación a otra, por ello es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones.

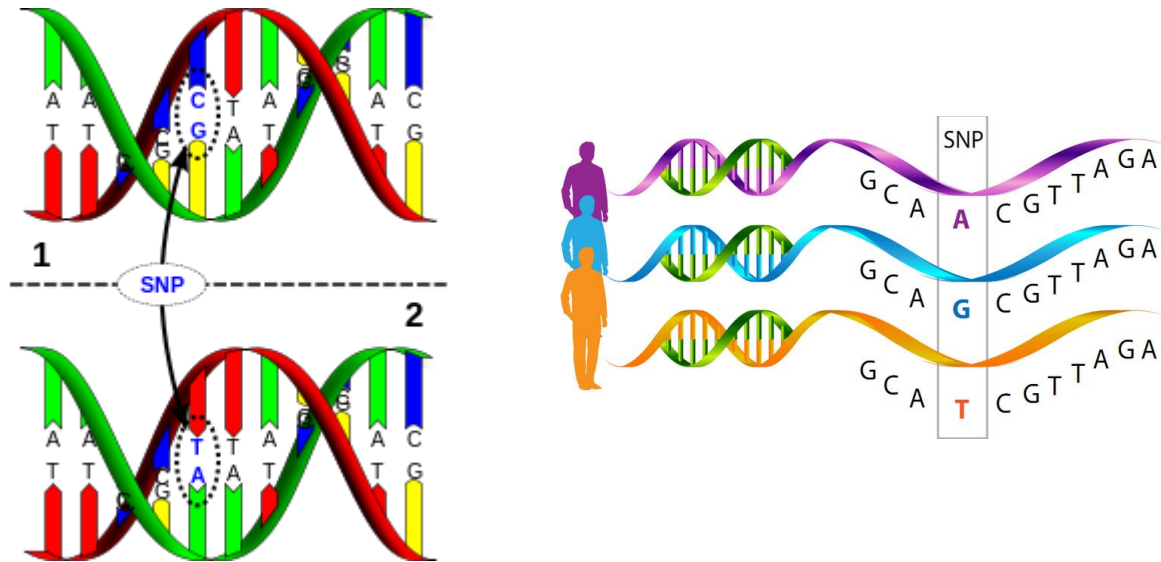


Figura 8. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Un SNP es el cambio de una base por otra en una posición particular del ADN. Los SNPs pueden aparecer cada 100, 500 o 1000 pares bases a lo largo del genoma. Los SNPs determinan el fenotipo de una persona: patrones de resistencia o susceptibilidad a enfermedades, resistencia a fármacos, etc.

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina *locus*. A cada posible variante se le denomina alelo. Si se trata de un SNP, normalmente serán 2 los posibles alelos en un *locus*: por ejemplo, el cambio de C por T (C>T). Si el *locus* corresponde a un cromosoma autosómico (del 1 al 22), cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. Así, las 3

posibilidades de parejas de alelos (genotipos) para el SNP del ejemplo anterior serían TT, CT y CC. Los individuos con los 2 alelos idénticos son homocigotos y los que tienen diferentes alelos, heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

El estudio de los SNPs es de utilidad como marcadores genéticos en investigación médica, por ejemplo en la detección de genes de resistencia o susceptibilidad a enfermedades, identificación individual, etc. En los humanos, los SNPs forman hasta el 90% de todas las variaciones genéticas y aparecen en promedio uno cada 100 a 500 o 1000 bases a lo largo del genoma. Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar la respuesta de los individuos a diversas enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc. [43].

2.5 Polimorfismos genéticos en el sistema HIF-1 α

Considerando la importancia de HIF-1 α en mediar la respuesta celular a la hipoxia, se esperaría que los polimorfismos que irrumpen su función, pudieran alterar la respuesta a la hipoxia en los tejidos. Se ha reportado que tanto los polimorfismos de este gen, así como la expresión de sus proteínas asociadas, están relacionados con la susceptibilidad o desarrollo de algunas enfermedades [44].

Actualmente, se han validado poco más de 14 SNPs que se localizan en regiones codificantes, pero en años recientes el grupo de Yamada y cols. secuenciaron una extensión de 38 kb de la región codificante de HIF-1 α , reportando un total de 35 SNPs dentro del gen, de los cuales 32 se localizan en regiones no codificantes, y 3 en regiones codificantes [45]. Por su parte, Hong y cols. secuenciaron el gen y 1500 pb de la región promotora, identificando 4 SNPs en diferentes regiones: -2755 C > A en el promotor, 41224 T > C en un intrón, 45319 C > T en un exón, y 51610 C > T en la región 3' no traducida [46].

En la **Figura 9** se ilustra la estructura del gen *HIF1A*, localizado en el cromosoma 14q21-23, el cual consta de 15 exones interrumpidos por 14 intrones. Uno de los sitios más polimórficos y de mayor interés de *HIF1A*, se localiza en el exón 12 [47, 48]. En esta región se encuentran dos de los SNPs más estudiados con implicaciones médicas de gran relevancia [49].

En las **Figuras 6 y 7** se muestran algunas de las proteínas que se ven involucradas en la vía de señalización de HIF-1 α asociadas con la OA; desde la activación (un estímulo externo), hasta las proteínas que se unen al ADN para iniciar la transcripción de genes asociados con la homeostasis del cartílago articular. Sin embargo, la estructura y función de estas proteínas pueden verse alteradas por la presencia de SNPs de sus respectivos genes. A su vez, estos polimorfismos pueden tener un efecto distinto (mayor o menor) en el desarrollo de OA debido a la interacción entre estos mismos.

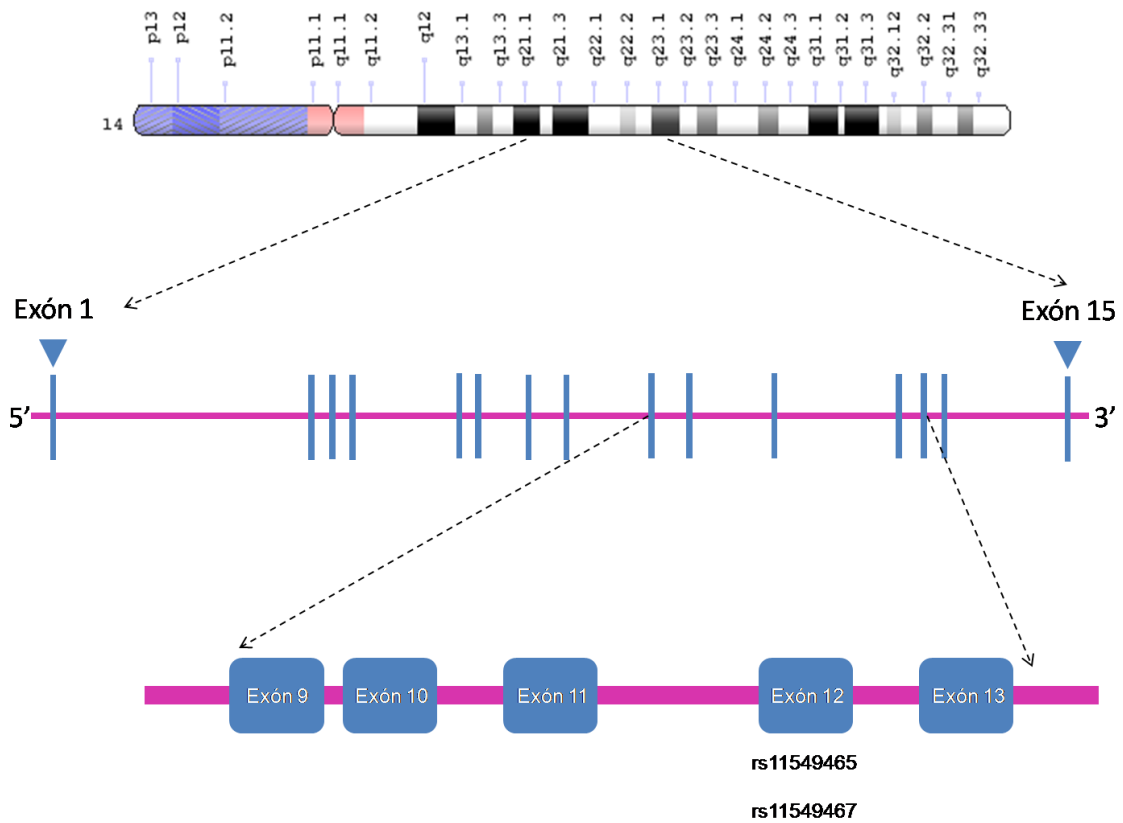


Figura 9. Localización del gen *HIF1A* en el cromosoma 14. El gen *HIF1A* está constituido por 15 exones y está localizado en la región 14q21-23. Dentro del exón 12, hay polimorfismos con elevada capacidad transcripcional con implicaciones médicas relevantes.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Con base a lo anterior, hemos planteado la siguiente pregunta: ¿Cómo interaccionan los polimorfismos de la vía de señalización del HIF-1 α en la OA de rodilla?

4. HIPÓTESIS

La interacción de los polimorfismos de la vía de señalización de HIF-1 α afecta el desarrollo de OA de rodilla

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la interacción de los polimorfismos de un solo nucleótido de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes mexicanos con OA de rodilla.

5.1. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a pacientes con OA de rodilla y a personas sanas mediante criterios clínicos y radiológicos, y evaluar parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos.
- b) Analizar 42 polimorfismos de 22 genes candidatos de la vía de señalización de HIF-1 α en los grupos de estudio.
- c) Analizar la distribución de los polimorfismos seleccionados y determinar las frecuencias génicas y alélicas en los grupos de estudio.

- d) Analizar la distribución de los polimorfismos asociados en grupos estratificados por género y por edad (≤ 50 años, > 50 años).
- e) Evaluar la suma de efectos mínimos de cada uno de los polimorfismos que resulten asociados.
- f) Analizar los haplotipos de los polimorfismos que resulten asociados.
- g) Analizar las interacciones gen-gen de los polimorfismos asociados.

6. MATERIAL Y METODOS

Cuatrocientos y uno individuos de origen mestizo-Mexicano no emparentados fueron reclutados para este estudio en el periodo de septiembre de 2013 a septiembre de 2016. Todos los participantes de este estudio fueron informados sobre el contenido del mismo, y firmaron carta de consentimiento (la cual incluía datos sobre edad, género, peso, índice de masa corporal –IMC-, y lugar de nacimiento). Este trabajo de investigación se basa en los criterios de la Declaración de Helsinki. El diseño de este estudio es observacional de casos y controles.

6.1 Tamaño de muestra

El tamaño de la “n” se apegó al número de muestras que pudieron ser analizadas en el arreglo de baja densidad. Se recolectaron 134 muestras de casos y 267 controles.

6.2 Muestreo

No probabilístico, de casos y controles consecutivos, preferentemente de la misma edad, género, y lugar de nacimiento. Este muestreo se basó en la técnica donde los participantes son elegidos a juicio del investigador.

6.3 Grupos de estudio

6.3.1 Criterios de inclusión.

- a) Grupo de pacientes (casos). 94 pacientes de ambos géneros con diagnóstico de OA de rodilla se reclutaron de la cohorte del Servicio de Reumatología del INR, y 40 del Servicio de Reumatología del Hospital Civil de Guadalajara, Jalisco. El diagnóstico de la OA se basó en parámetros clínicos y radiológicos (escala de Kellgren-Lawrence ≥ 2) definidos por los criterios del Colegio Americano de Reumatología [14].

- b) Grupo control. El segundo grupo estuvo conformado por 150 personas de una población cautiva de trabajadores del INR-LGII, y 117 de Guadalajara, Jalisco, que refirieron gozar de buena salud, sin evidencia clínica de OA de rodilla ni con antecedentes familiares de OA. Los participantes fueron evaluados clínicamente por reumatólogos quienes certificaron la ausencia de signos o síntomas de OA, así como de otras artropatías o cualquier desorden articular (dolor crónico, inflamación,

sensibilidad, hinchazón o limitación de movimiento). Posteriormente, se les realizó radiografías de rodilla.

Todos los participantes de ambos grupos fueron mayores 40 años.

6.3.2 Criterios de exclusión

- La presencia de una enfermedad autoinmune concomitante con la OA:
- Artritis reumatoide.
- Artropatías metabólicas asociadas.
- Pacientes con displasias óseas y articulares.
- Artropatías microcristalinas (gota o pseudogota).
- Tumores óseos.
- Antecedentes de poliomielitis.
- Extranjeros.

6.3.3 Criterios de eliminación

- Muestras con indicios de contaminación del ADN.
- Zona gris en la interpretación de radiológica.
- Retiro voluntario de los pacientes.

6.3.4 Tabla 1. Operacionalización de variables

Variable	Tipo de variable	Definición	Operacionalización	Nivel de medición
OA	Dependiente	La marca de la OA es la pérdida del cartílago articular, y alteraciones en el hueso subcondral, lo que compromete a toda la articulación. Concluye con dolor y discapacidad física.	El diagnóstico de la OA se establece por medio de los criterios del CAR, basados en radiológicos (escala radiológica de Kellgren y Lawrence); y clínicos (grado de dolor, crepitación, nódulos, etc.).	Variable cualitativa dicotómica; determina si tiene o no OA por medio de la escala visual K-L.
SNP	Independiente	Cambio de una base nitrogenada por otra en el ADN. Su presencia puede alterar la expresión proteica, condicionando a susceptibilidad o resistencia a ciertas enfermedades.	Los SNPs generalmente se determinan por PCR en tiempo real. El ADN extraído se amplifica y por medio de una exonucleasa y fluoróforos, emite una luz de determinada longitud de onda, que puede ser analizada.	Variable cualitativa categórica. Presencia o ausencia de SNP. Sin embargo, las unidades de fluorescencia pueden tener diferentes valores.

OA = osteoartritis; SNP = polimorfismo de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism); PCR = reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction).

6.4 Desarrollo metodológico

6.4.1 Obtención de muestras biológicas

Se recolectó sangre periférica por venopunción de cada individuo en los dos grupos de estudio. Una muestra de sangre sin anticoagulante fue para el estudio de química sanguínea, y otra muestra de sangre con EDTA para obtener el ADN genómico. El riesgo para la obtención de sangre es mínimo.

6.4.2 Extracción del ADN genómico

El ADN genómico se aisló de las muestras de sangre utilizando el Mini Kit QIAmp DNA (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ADNs obtenidos se cuantificaron por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración final del ADN se ajustó a $50\text{ ng}/\mu\text{L}$.

6.4.3 Selección de polimorfismos para el arreglo de baja densidad

Los SNPs candidatos se seleccionaron por métodos y criterios bien definidos: bases de datos [50, 51] y fuentes de literatura públicas (PubMed); además, se utilizaron criterios epidemiológicos de nuestra población:

- Frecuencia $> 1\%$ en población mexicana.
- No estar en desequilibrio de ligamiento (LD) con un valor de $\delta' < 0.98$, para que el análisis pueda ser individual. Un valor de $\delta' > 0.98$ implicaría redundar el valor de un polimorfismo con otro.
- El orden preferencial de selección de los SNPs fue primero en las regiones promotoras, seguido de exones, y finalmente en intrones.

Los polimorfismos genéticos seleccionados se clasificaron con base a su proteína asociada de acuerdo a las siguientes categorías: a) que activen la vía de HIF-1 α ; b) que interactúen directamente con HIF-1 α ; y c) genes inducidos por

HIF-1 α (Tabla 2). Finalmente, para tener una mejor selección de los grupos de estudio, se incluyeron 9 polimorfismos de ancestría mexicana. Debido a que la población mestiza mexicana es una compleja mezcla de diferentes poblaciones (principalmente Amerindia, Europea y Africana), se utilizaron marcadores informativos de ancestría (AIMs, *por sus siglas en inglés*) para ajustar las asociaciones resultantes. Para ello, se utilizó un panel de 9 AIMs que permite distinguir principalmente ancestros amerindios, europeos y africanos. Estos 9 AIMs contaron con una diferencia en sus frecuencias alélicas de $\delta \geq 0.44$ [52, 53].

Tabla 2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) estudiados.

Gen	db SNP rs ID	Cromosoma	Región	MAF	Consecuencia
Genes que activan a HIF-1α					
<i>PIK3R1</i>	rs3730089	Chr.5:67588148	Intron	A	Variante sin sentido
<i>AKT2</i>	rs8100018	Chr.19:40752023	Intron	C	Variante intrónica
<i>GSK3B</i>	rs6438552	Chr.3:119631814	Intron	A	Variante intrónica
<i>IL6</i>	rs1474347	Chr.7:22768124	Exon	C	Transcrito no codificante
<i>AGER</i>	rs2070600	Chr.6:32151443	Intron	T	Variante sin sentido
<i>AGER</i>	rs1800624	Chr.6:32152387	5' UTR	T	Variante de corriente arriba
<i>AGER</i>	rs1035798	Chr.6:32151222	Intron	T	Variante de región de empalme
Genes que interactúan con HIF-1α					
<i>HIF1A</i>	rs2057482	Chr.14:62213848	3'UTR	T	Variante en 3'UTR
<i>HIF1A</i>	rs11549465	Chr.14:62207557	Exon	T	Pro582Ser
<i>HIF1A</i>	rs11549467	Chr.14:62207575	Exon	A	Ala588Thr
<i>EGLN1</i>	rs12406290	Chr.1:231559226	5'UTR	G	Variante en 3'UTR
<i>EGLN1</i>	rs1339894	Chr.1:231560557	5'UTR	A	Variante en 3'UTR
<i>EGLN1</i>	rs2739513	Chr.1:231515201	Intron	T	Variante intrónica
<i>EGLN1</i>	rs2009873	Chr.1:231499236	3'UTR	T	Variante de corriente abajo
<i>VHL</i>	rs779805	Chr.3:10183337	5'UTR	G	Variante en 5'UTR
<i>VHL</i>	rs1678607	Chr.3 :10188428	Intron	T	Variante intrónica
<i>VHL</i>	rs1642742	Chr.3:10191943	3'UTR	G	Variante en 3'UTR
<i>HIF1AN</i>	rs1054399	Chr.10:102312565	3'UTR	T	Variante en 3'UTR
<i>HIF1AN</i>	rs11190613	Chr.10:102313997	3'UTR	C	Variante en 3'UTR
<i>HIF1AN</i>	rs11292	Chr.10:102313607	3'UTR	G	Variante en 3'UTR
Genes inducidos por HIF-1α					
<i>VEGFA</i>	rs699947	Chr.6:43736389	5'UTR	A	Variante de corriente arriba
<i>VEGFA</i>	rs1570360	Chr.6:43737830	5'UTR	A	Variante de corriente arriba
<i>VEGFA</i>	rs3025039	Chr.6:43752536	3'UTR	T	Variante en 3'UTR
<i>VEGFA</i>	rs729761	Chr.6 :43804571	Intergenic	T	Variante de región regulatoria
<i>EPO</i>	rs1617640	Chr.7:100317298	5'UTR	C	Variante de corriente arriba
<i>NOS2</i>	rs1060826	Chr.17:26089867	-	T	Variante sinónima
<i>NOS2</i>	rs2297518	Chr.17:26096597	Intron	A	Variante sin sentido
<i>NOS3</i>	rs2070744	Chr.7:150690079	Intron	C	Variante intrónica
<i>IGF1</i>	rs35767	Chr.12:102875569	5'UTR	A	Variante de corriente arriba
<i>IGF1</i>	rs2288377	Chr.12:102874762	5'UTR	T	Variante de corriente arriba
<i>EGF</i>	rs4444903	Chr.4:110834110	5'UTR	A	Variante en 5'UTR
<i>EDN1</i>	rs1800541	Chr.6:12289219	5'UTR	G	Variante de corriente arriba
<i>EDN1</i>	rs5370	Chr.6:12296255	Exon	T	Lys198Asn

<i>MMP1</i>	rs2239008	Chr.11:102661080	3'UTR	A	Variante en 3'UTR
<i>MMP3</i>	rs679620	Chr.11:102713620	-	G	Región codificante
<i>MMP13</i>	rs2252070	Chr.11:102826539	5'UTR	C	Variante de corriente arriba
<i>MMP13</i>	rs12792912	Chr.11 :102801303	-	G	Sustitución tansversión
<i>CA</i>	rs1703290	Chr.5:4062706	Intergenic	G	Variante intergénica
<i>COL2A1</i>	rs2276454	Chr.12:48376291	-	A	Variante sinónima
<i>COL2A1</i>	rs1793953	Chr.12:48393526	Exon	A	Transcrito no codificante
<i>COL3A1</i>	rs1800255	Chr. 2:189864080	Exon	A	Variante sin sentido
<i>COL3A1</i>	rs2138533	Chr.2:189837212	5'UTR	T	Variante de gen corriente arriba
Marcadores de					
ancestría (AIMs)					
<i>rs2695</i>	rs2695	Chr.9:82884577	Intergenic	T	Variante intergénica
<i>rs2862</i>	rs2862	Chr.15:35145553	5'UTR	C	Variante de gen corriente arriba
<i>SAP30L</i>	rs3340	Chr.5 :153831867	Intron	C	Variante intrónica
<i>CKM</i>	rs4884	Chr.19 :45810035	-	A	Variante sinónima
<i>rs722098</i>	rs722098	Chr.21 :16685598	Intergenic	A	Variante intergénica
<i>CA10</i>	rs203096	Chr.17:50011769	Intron	T	Variante intrónica
<i>rs223830</i>	rs223830	Chr.16:57451971	3'UTR	C	Variante de corriente abajo
<i>DRD2</i>	rs1800498	Chr.11:113291588	Intron	A	Variante intrónica
<i>PRKCE</i>	rs2814778	Chr.1:159174683	5'UTR	C	Variante en 5'UTR

MAF, frecuencia del alelo menor; AIMs, marcadores informativos de ancestría; variante sin sentido, una variante de secuencia que tiene una o más bases, dando como resultado una secuencia de aminoácidos diferente, pero donde se conserva la longitud; variante intrónica, una variante de transcripción que ocurre dentro de un intrón; variante de exón de transcripción no codificante, una variante de secuencia que cambia la secuencia de exón no codificante en una transcripción no codificante; variante de gen corriente arriba, una variante de secuencia localizada en 5' de un gen; variante de región de empalme, una variante de secuencia en la que se ha producido un cambio dentro de la región del sitio de empalme, ya sea dentro de 1-3 bases del exón o 3-8 bases del intrón; variante de gen corriente abajo, una variante de secuencia ubicada en 3' de un gen; variante de región regulatoria, una variante de secuencia ubicada dentro de una región reguladora; variante sinónima, una variante de secuencia donde no hay cambio resultante en el aminoácido codificado; variante intergénica, entre genes.

Para el análisis de los 42 SNPs junto con los de ancestría, se utilizó la plataforma QuantStudio 12K Flex OpenArray Genotyping Plates (*Life Technologies*) (**Figura 10**). Las muestras de ADN genómico se normalizaron a 50 ng/μl para hacer una mezcla de 2,5 μl de ADN y 2,5 μl de TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en placas de 384 pocillos. Las mezclas de cada muestra se cargaron en el equipo OpenArray, utilizando el sistema de llenado AccuFill (Thermo Fisher Scientific). La amplificación se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante. Los resultados en crudo se analizaron utilizando el software TaqMan Genotyper v1.2.

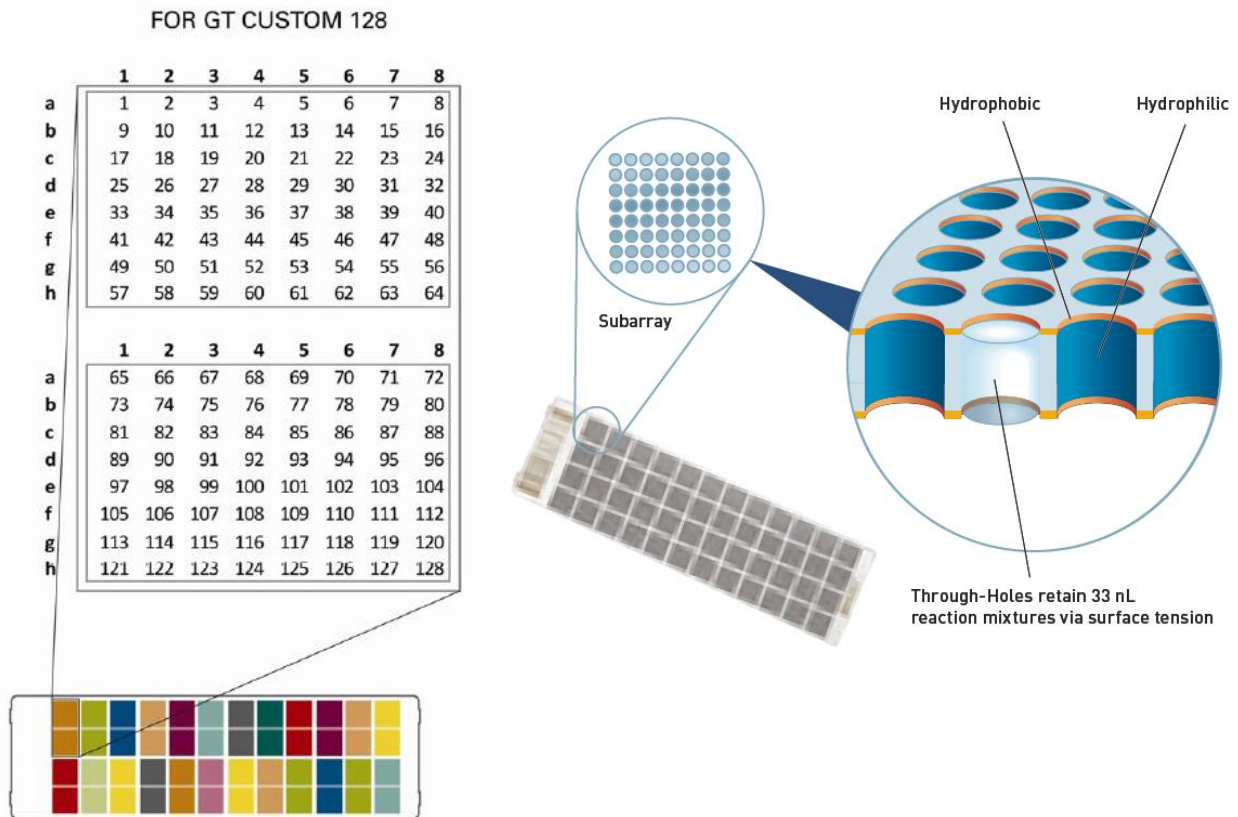
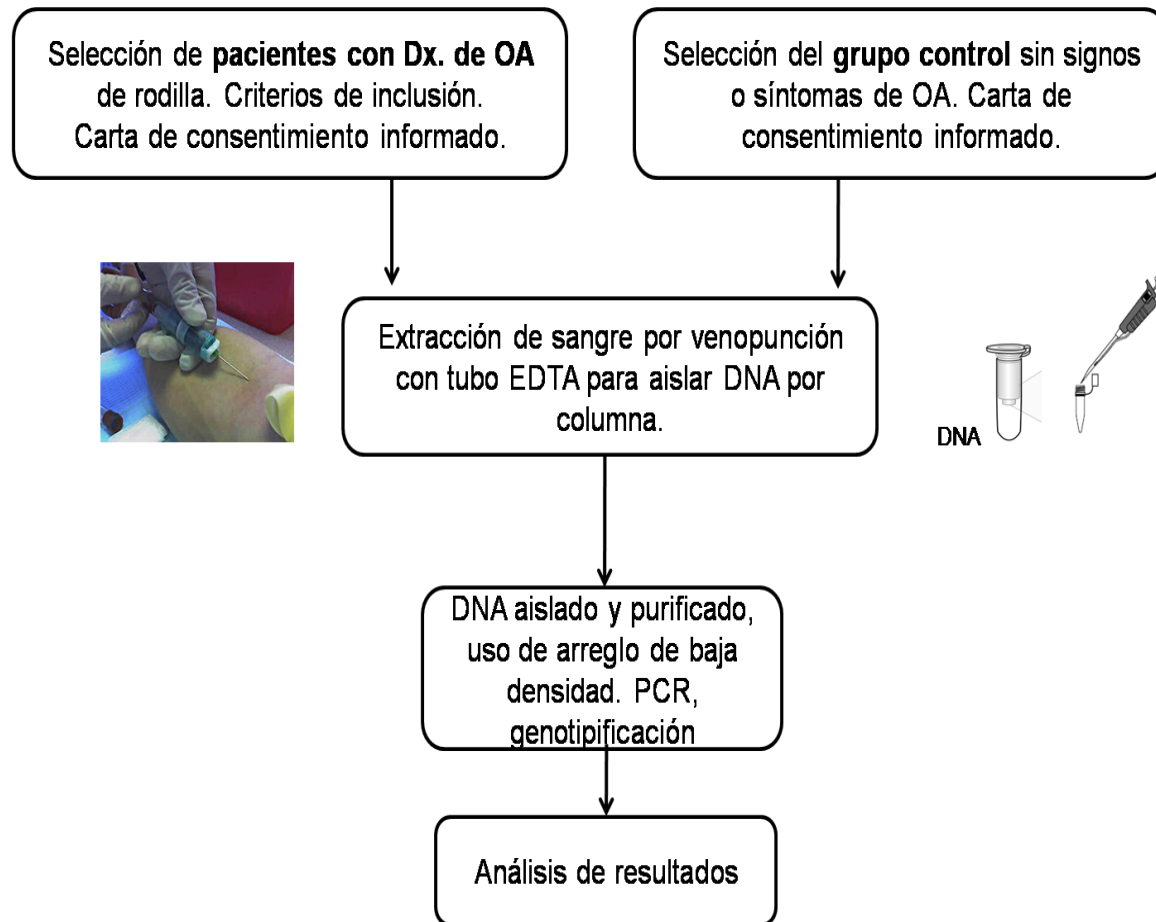


Figura 10. Arreglo de baja densidad OpenArray. La tecnología OpenArray utiliza chips con micropozos de 300 μm de diámetro y 300 μm de profundidad, y un volumen de muestra con master mix de 33 nL. En total son 3072 pozos en cada chip. Al seleccionar un arreglo con 128 polimorfismos, se pueden procesar 24 muestras por chip. Dentro de cada pocillo se lleva a cabo una reacción de PCR la cual utiliza sondas TaqMan.

6.4.4 Diagrama de flujo operacional



6.4.4 **Figura 11.** Diagrama de flujo operacional

6.4.5. Análisis estadístico

- Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) mediante el coeficiente de endogamia (F_{is}); es decir, la heterocogocidad.

- Se calcularon las frecuencias génicas y alélicas en los dos grupos de estudio utilizando la prueba de X^2 ; o bien, la prueba exacta de Fisher cuando fue apropiado.
- Para estimar riesgos de desarrollo de OA, se calcularon las razones de momios (OR) mediante un análisis de regresión logística multivariado con un intervalo de confianza del 95%.
- Con los 9 AIMS se hizo un análisis de regresión logística multivariado ajustando por edad, género e IMC para evaluar el efecto de la estratificación poblacional sobre las asociaciones encontradas; STRUCTURE v2.3.4.
- Con el fin de evaluar el efecto de los SNPs con las variables clínicas, se estratificaron a los pacientes por género y edad (etapa temprana, ≤ 50 años; y edad tardía de OA, >50 años).
- Para evaluar el efecto individual de cada alelo, se hizo un análisis de suma de efectos mínimos de los polimorfismos que resultaron asociados.
- Así mismo, a partir de los alelos de SNPs individuales, se construyeron haplotipos para determinar cual tiene mayor o menor efecto protector o de riesgo.
- Se hizo un análisis de interacción gen-gen (epistasis) para evaluar si existe un efecto sinérgico, antagónico o nulo entre los genes de riesgo y/o protección que resultaron asociados al desarrollo de la OA, utilizando el software Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) v3.0.2 [54-59]; los resultados de este análisis fueron corroborados mediante modelos de

regresión logística. El valor de los ORs de los genotipos de alto y bajo riesgo se calcularon de acuerdo al método descrito por Chung y cols. [60].

- Todos los valores con una $p \leq 0.05$, se consideraron estadísticamente significativos, y se calcularon con el software estadístico STATA v14.0 (StataCorp, Texas, USA).

7. RESULTADOS

Las variables demográficas (edad, género, IMC y lugar de origen) de los grupos de estudio, se muestran en la **Tabla 3**. La edad promedio del grupo OA fue mayor que el grupo control ($p < 0.0001$, 51.3 ± 13.5 vs. 43.6 ± 11.3 , respectivamente). De la misma manera, el IMC fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con OA en comparación con los controles ($p < 0.0001$, 29.2 ± 4.8 vs. 26.1 ± 4.8 kg/cm², respectivamente). En relación al género, fue mayor el femenino que el masculino en los dos grupos de estudio (88.0% en OA y 70.0% en controles, $p < 0.0001$); la distribución por lugar de nacimiento, fue similar en los dos grupos de estudio ($p = 0.146$).

Tabla 3. Características de la población de estudio

Parámetro	Total (n=401)	OA (n=134)	Control (n=267)	p
Edad (años)	46.1±12.6	51.3±13.5	43.6±11.3	<0.0001
IMC (Kg/cm ²)	27.2±5.0	29.2±4.8	26.1±4.8	<0.0001
<i>Género</i>				
Femenino (%)	305 (76.0)	118 (88.0)	187 (70.0)	<0.0001*
Masculino (%)	96 (24.0)	16 (12.0)	80 (30.0)	
<i>Lugar de nacimiento</i>				
CDMX	192 (47.8)	71 (52.9)	121 (45.3)	0.146*
Otros estados	209 (52.2)	63 (47.1)	146 (54.7)	

Los datos están expresados como media ± DS; los valores de p se estimaron utilizando la prueba de t de Student, $\alpha=0.05$.

La distribución de los polimorfismos en los grupos de estudio, fue consistente con el EHW excepto para los polimorfismos *HIF1AN* rs11292, *HIF1A* rs11549465 and *EGLN1* rs1339894. En la **Tabla 4** se muestran las frecuencias génicas y alélicas de los 42 SNPs de la vía de señalización de HIF-1 α y de los 9 AIMs entre casos y controles (valores de OR crudos). Después de ajustar por edad, género, IMC y ancestría, se encontraron asociaciones significativas únicamente para 10 SNPs (**Tabla 6**): genotipos y alelos de bajo riesgo de desarrollar OA: genotipo CC y alelo C de *AKT2* rs8100018 (OR=0.17, 95% CI=0.05–0.55, $p=0.003$, y OR=0.58, 95% CI=0.38–0.87, $p=0.009$, respectivamente), genotipo CT y alelo T de *AGER* rs2070600 (OR=0.05, 95% CI=0.00–0.47, $p=0.008$, y OR=0.23, 95% CI=0.08–0.64, $p=0.005$, respectivamente), genotipo AG de *HIF1AN* rs11292 (OR=0.37, 95% CI=0.14–0.96, $p=0.04$), genotipo AA y alelo A de *EGLN1* rs1339894 (OR=0.05, 95% CI=0.00–0.45, $p=0.007$, y OR=0.39, 95%

CI=0.22–0.70, p=0.001, respectivamente), genotipo AA de *VEGFA* rs1570360 (OR=0.31, 95% CI=0.10–0.93, p=0.03), y genotipo GA de *COL2A1* rs1793953 (OR=0.48, 95% CI=0.28–0.82, p=0.008). Por otro lado, los genotipos y alelos de alto riesgo fueron AG de *GSK3B* rs6438552 (OR=2.58, 95% CI=1.16–4.45, p=0.01), CT y alelo T de *HIF1A* rs11549465 (OR=3.14, 95% CI=1.82–5.42, p=0.000, y OR=2.07, 95% CI=1.33–3.23, p=0.001, respectivamente), AT y alelo T de *IGF1* rs2288377 (OR=1.86, 95% CI=1.08–3.20, p=0.02, y OR=1.63, 95% CI=1.01–2.63, p=0.04, respectivamente), y el GA y alelo A de *IGF1* rs35767 (OR=2.00, 95% CI=1.17–3.42, p=0.01, y OR=1.51, 95% CI=1.02–2.25, p=0.03, respectivamente).

Tabla 4. Distribución de los SNPs de la vía de señalización de HIF-1 α en casos OA y controles (valores crudos).

Gen (SNP rs ID)	OA N (%)	Controles N (%)	OR (95% IC)	p
<i>PIK3R1</i> (rs3730089)				
GG	36 (47.4)	35 (44.9)	1.00 (referencia)	
GA	34 (44.7)	33 (42.3)	1.08 (0.53 – 2.18)	0.835
AA	6 (7.89)	10 (12.8)	0.84 (0.24 – 2.90)	0.789
G	106 (69.7)	103 (66.0)		
A	46 (30.3)	53 (34.0)	0.98 (0.59 – 1.62)	0.943
<i>AKT2</i> (rs8100018)				
GG	44 (55.0)	46 (56.8)	1.00 (referencia)	
GC	33 (41.2)	25 (30.9)	1.46 (0.72 – 2.93)	0.288
CC	3 (3.75)	10 (12.3)	0.39 (0.09 – 1.60)	0.193
G	121(75.6)	117 (72.2)		
C	39 (24.4)	45 (27.8)	0.92 (0.54 – 1.56)	0.764
<i>GSK3B</i> (rs6438552)				
AA	21 (33.3)	24 (38.1)	1.00 (referencia)	
AG	30 (47.6)	23 (36.5)	1.58 (0.68 – 3.65)	0.281
GG	12 (19.0)	16 (25.4)	0.98 (0.35 – 2.71)	0.978
A	72 (57.1)	71 (56.3)		
G	54 (42.9)	55 (43.7)	1.05 (0.62 – 1.77)	0.850
<i>IL6</i> (rs1474347)				
AA	67 (83.7)	61 (72.6)	1.00 (referencia)	
AC	12 (15.0)	19 (22.6)	0.67 (0.29 – 1.56)	0.358
CC	1 (1.25)	4 (4.76)	0.21 (0.02 – 2.12)	0.188
A	146 (91.2)	141 (83.9)		
C	14 (8.8)	27 (16.1)	0.55 (0.27 – 1.12)	0.100
<i>AGER</i> (rs2070600)				
CC	53 (94.6)	95 (88.0)	1.00 (referencia)	
CT	1 (1.79)	5 (4.63)	0.32 (0.03 – 3.05)	0.323
TT	2 (3.57)	8 (7.41)	0.50 (0.09 – 2.60)	0.415
C	107 (95.5)	195 (90.3)		

T	5 (4.50)	21 (9.70)	0.46	(0.16 – 1.31)	0.149
AGER (rs1800624)					
AA	40 (44.9)	59 (47.6)	1.00	(referencia)	
AT	39 (43.8)	49 (39.5)	1.27	(0.67 – 2.39)	0.448
TT	10 (11.2)	16 (12.9)	0.78	(0.30 – 2.02)	0.616
A	119 (66.9)	167 (67.3)			
T	59 (33.1)	81 (32.7)	0.98	(0.63 – 1.52)	0.945
AGER (rs1035798)					
GG	39 (45.3)	56 (46.3)	1.00	(referencia)	
GA	37 (43.0)	50 (41.3)	1.19	(0.63 – 2.25)	0.572
AA	10 (11.6)	15 (12.4)	0.86	(0.33 – 2.23)	0.759
G	115 (66.9)	162 (66.9)			
A	57 (33.1)	80 (33.1)	1.00	(0.64 – 1.55)	0.994
HIF1A (rs2057482)					
CC	44 (84.6)	100 (82.6)	1.00	(referencia)	
CT	8 (15.4)	21 (17.4)	0.84	(0.33 – 2.12)	0.717
TT	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-	-
C	96 (92.3)	221 (91.3)			
T	8 (7.69)	21 (8.7)	0.85	(0.35 – 2.06)	0.730
HIF1A (rs11549465)					
CC	40 (47.0)	44 (51.8)	1.00	(referencia)	
CT	45 (53.0)	41 (48.2)	1.05	(0.56 – 1.99)	0.861
TT	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-	-
C	125 (73.5)	129 (75.9)			
T	45 (26.5)	41 (24.1)	1.03	(0.62 – 1.73)	0.887
HIF1A (rs11549467)					
GG	67 (100)	86 (95.6)	1.00	(referencia)	
GA	0 (0.00)	3 (3.33)	-	-	-
AA	0 (0.00)	1 (1.11)	-	-	-
A	134 (100)	175 (97.2)			
G	0 (0.00)	5 (2.30)	-	-	-
EGLN1 (rs12406290)					
AA	29 (47.5)	35 (52.2)	1.00	(referencia)	
AG	16 (26.3)	15 (22.4)	1.23	(0.50 – 3.02)	0.648
GG	16 (26.3)	17 (25.4)	1.17	(0.49 – 2.83)	0.713
A	74 (60.7)	85 (63.4)			
G	48 (39.3)	49 (36.6)	1.14	(0.67 – 1.94)	0.609
EGLN1 (rs1339894)					
GG	70 (86.4)	66 (85.7)	1.00	(referencia)	
GA	11 (13.6)	9 (11.7)	1.25	(0.45 – 3.40)	0.661
AA	0 (0.00)	2 (2.60)	-	-	-
G	151 (93.2)	141 (91.6)			
A	11 (6.79)	13 (8.40)	0.87	(0.36 – 2.10)	0.759
EGLN1 (rs2739513)					
CC	20 (31.2)	26 (28.3)	1.00	(referencia)	
CT	24 (37.5)	42 (45.6)	0.79	(0.34 – 1.82)	0.595
TT	20 (31.2)	24 (26.1)	1.26	(0.51 – 3.08)	0.605
C	64 (50.0)	94 (51.1)			
T	64 (50.0)	90 (48.9)	1.14	(0.70 – 1.85)	0.574
EGLN1 (rs2009873)					
CC	22 (27.5)	35 (29.4)	1.00	(referencia)	
CT	38 (47.5)	56 (47.1)	1.06	(0.51 – 2.18)	0.869
TT	20 (25.0)	28 (23.5)	1.07	(0.46 – 2.46)	0.866
C	82 (51.2)	126 (52.9)			
T	78 (48.8)	112 (47.1)	1.03	(0.67 – 1.59)	0.860
VHL (rs779805)					
AA	34 (40.0)	39 (37.5)	1.00	(referencia)	
AG	43 (50.6)	53 (51.0)	0.99	(0.52 – 1.90)	0.992
GG	8 (9.4)	12 (11.5)	0.79	(0.27 – 2.24)	0.662
A	111 (65.3)	131 (63.0)			
G	59 (34.7)	77 (37.0)	0.93	(0.59 – 1.45)	0.751
VHL (rs1678607)					
GG	57 (72.1)	74 (68.5)	1.00	(referencia)	
GT	21 (26.6)	31 (28.7)	0.80	(0.40 – 1.60)	0.547
TT	1 (1.30)	3 (2.80)	0.74	(0.07 – 7.82)	0.807
G	135 (85.4)	179 (82.9)			
T	23 (14.6)	37 (17.1)	0.83	(0.45 – 1.50)	0.542
VHL (rs1642742)					

AA	32 (40.5)	30 (39.5)	1.00	(referencia)	
AG	41 (51.9)	37 (48.7)	1.12	(0.55 – 2.27)	0.739
GG	6 (7.60)	9 (11.8)	0.59	(0.18 – 1.94)	0.390
A	105 (66.5)	97 (63.8)			
G	53 (33.5)	55 (36.2)	0.89	(0.54 – 1.46)	0.660
HIF1AN (rs1054399)					
CC	68 (79.1)	58 (67.4)	1.00	(referencia)	
CT	15 (17.4)	25 (29.1)	0.54	(0.24 – 1.18)	0.124
TT	3 (3.50)	3 (3.50)	0.84	(0.15 – 4.51)	0.840
C	151 (87.8)	141 (82.0)			
T	21 (12.2)	31 (18.0)	0.66	(0.34 – 1.25)	0.203
HIF1AN (rs11190613)					
TT	68 (79.1)	61 (67.0)	1.00	(referencia)	
CT	11 (12.8)	25 (27.5)	0.43	(0.19 – 1.00)	0.050
CC	7 (8.10)	5 (5.50)	0.88	(0.25 – 3.14)	0.853
T	147 (85.5)	147 (80.8)			
C	25 (14.5)	35 (19.2)	0.65	(0.35 – 1.17)	0.156
HIF1AN (rs11292)					
AA	61 (81.3)	51 (62.2)	1.00	(referencia)	
AG	0 (0.00)	13 (15.8)	-	-	-
GG	14 (18.7)	18 (22.0)	0.70	(0.30 – 1.63)	0.416
A	122 (81.3)	115 (70.1)			
G	28 (18.7)	49 (29.9)	0.58	(0.33 – 1.03)	0.065
VEGFA (rs699947)					
CC	39 (48.1)	59 (50.9)	1.00	(referencia)	
CA	34 (42.0)	41 (35.3)	1.02	(0.52 – 1.96)	0.951
AA	8 (9.90)	16 (13.8)	0.63	(0.23 – 1.72)	0.371
C	112 (69.1)	159 (68.5)			
A	50 (30.9)	73 (31.5)	0.84	(0.53 – 1.34)	0.482
VEGFA (rs1570360)					
GG	43 (59.7)	56 (50.9)	1.00	(referencia)	
GA	27 (37.5)	33 (30.0)	1.19	(0.59 – 2.39)	0.614
AA	2 (2.80)	21 (19.1)	0.12	(0.02 – 0.59)	0.009
G	113 (78.5)	145 (65.9)			
A	31 (21.5)	75 (34.1)	0.55	(0.33 – 0.92)	0.025
VEGFA (rs3025039)					
CC	31 (38.7)	57 (48.3)	1.00	(referencia)	
CT	37 (46.2)	43 (36.4)	1.48	(0.76 – 2.88)	0.248
TT	12 (15.0)	18 (15.2)	1.23	(0.50 – 3.03)	0.641
C	99 (61.9)	157 (66.5)			
T	61 (38.1)	79 (33.5)	1.20	(0.77 – 1.88)	0.410
VEGFA (rs729761)					
GG	72 (82.8)	86 (67.7)	1.00	(referencia)	
GT	13 (14.9)	37 (29.1)	0.40	(0.19 – 0.84)	0.016
TT	2 (2.30)	4 (3.15)	0.44	(0.06 – 2.82)	0.389
G	157 (90.2)	209 (82.3)			
T	17 (9.80)	45 (17.7)	0.46	(0.24 – 0.86)	0.016
EPO (rs1617640)					
AA	43 (50.6)	39 (47.6)	1.00	(referencia)	
AC	33 (38.8)	38 (46.3)	0.74	(0.38 – 1.44)	0.379
CC	9 (10.6)	5 (6.10)	1.72	(0.50 – 5.94)	0.384
A	119 (70.0)	116 (70.7)			
C	51 (30.0)	48 (29.3)	1.02	(0.62 – 1.67)	0.922
NOS2 (rs1060826)					
CC	26 (30.2)	34 (41.5)	1.00	(referencia)	
CT	48 (55.8)	37 (45.1)	1.74	(0.85 – 3.53)	0.125
TT	12 (13.9)	11 (13.4)	1.06	(0.37 – 2.99)	0.904
C	100 (58.1)	105 (64.0)			
T	72 (41.9)	59 (36.0)	1.16	(0.73 – 1.84)	0.522
NOS2 (rs2297518)					
GG	65 (81.2)	66 (80.5)	1.00	(referencia)	
GA	14 (17.5)	15 (18.3)	0.86	(0.37 – 2.03)	0.746
AA	1 (1.25)	1 (1.22)	1.51	(0.08 – 26.0)	0.776
G	144 (90.0)	147 (89.6)			
A	16 (10.0)	17 (10.4)	0.94	(0.44 – 2.01)	0.886
NOS3 (rs2070744)					
TT	58 (66.7)	53 (63.1)	1.00	(referencia)	





TC	23 (26.4)	24 (28.6)	0.89	(0.42 – 1.86)	0.766
CC	6 (6.90)	7 (8.3)	0.64	(0.19 – 2.17)	0.484
T	139 (79.9)	130 (77.4)			
C	35 (20.1)	38 (22.6)	0.80	(0.46 – 1.40)	0.453
IGF1 (rs35767)					
GG	34 (43.0)	59 (59.0)	1.00	(referencia)	
GA	39 (49.4)	30 (30.0)	2.14	(1.08 – 4.25)	0.029
AA	6 (7.60)	11 (11.0)	1.21	(0.38 – 3.89)	0.739
G	107 (67.7)	148 (74.0)			
A	51 (32.3)	52 (26.0)	1.44	(0.88 – 2.37)	0.144
IGF1 (rs2288377)					
AA	45 (59.2)	81 (75.0)	1.00	(referencia)	
AT	30 (39.5)	26 (24.0)	1.97	(1.00 – 3.87)	0.049
TT	1 (1.30)	1 (1.00)	1.84	(0.10 – 31.0)	0.670
A	120 (78.9)	188 (87.0)			
T	32 (21.1)	28 (13.0)	1.72	(0.95 – 3.09)	0.071
EGF (rs4444903)					
GG	23 (28.0)	31 (27.7)	1.00	(referencia)	
GA	41 (50.0)	56 (50.0)	0.98	(0.48 – 2.00)	0.959
AA	18 (22.0)	25 (22.3)	1.08	(0.46 – 2.57)	0.846
G	87 (53.1)	118 (52.7)			
A	77 (46.9)	106 (47.3)	1.03	(0.67 – 1.59)	0.859
EDN1 (rs1800541)					
TT	68 (79.1)	92 (77.3)	1.00	(referencia)	
TG	17 (19.8)	21 (17.6)	1.25	(0.57 – 2.72)	0.575
GG	1 (1.10)	6 (5.00)	0.11	(0.00 – 1.39)	0.089
T	153 (88.9)	205 (86.1)			
G	19 (11.1)	33 (13.9)	0.761	(0.39 – 1.47)	0.421
EDN1 (rs5370)					
GG	57 (68.7)	67 (73.6)	1.00	(referencia)	
GT	25 (30.1)	21 (23.1)	1.53	(0.74 – 3.17)	0.246
TT	1 (1.20)	3 (3.30)	0.19	(0.01 – 3.66)	0.277
G	139 (83.7)	155 (85.2)			
T	27 (16.3)	27 (14.8)	1.15	(0.62 – 2.16)	0.644
MMP1 (rs2239008)					
GG	46 (57.5)	45 (57.7)	1.00	(referencia)	
GA	29 (36.2)	22 (28.2)	1.23	(0.59 – 2.55)	0.565
AA	5 (6.30)	11 (14.1)	0.40	(0.12 – 1.31)	0.132
G	121 (75.6)	112 (71.8)			
A	39 (24.4)	44 (28.2)	0.77	(0.45 – 1.30)	0.340
MMP3 (rs679620)					
CC	39 (48.7)	41 (49.4)	1.00	(referencia)	
CT	30 (37.5)	17 (20.5)	1.67	(0.77 – 3.62)	0.190
TT	11 (13.8)	25 (30.1)	0.51	(0.20 – 1.25)	0.145
C	108 (67.5)	99 (59.6)			
T	52 (32.5)	67 (40.4)	0.76	(0.47 – 1.24)	0.285
MMP13 (rs2252070)					
TT	38 (44.7)	46 (48.9)	1.00	(referencia)	
TC	41 (48.2)	41 (43.6)	1.18	(0.62 – 2.26)	0.603
CC	6 (7.10)	7 (7.50)	1.09	(0.32 – 3.71)	0.889
T	117 (68.8)	133 (70.7)			
C	53 (31.2)	55 (29.3)	1.09	(0.68 – 1.76)	0.700
MMP13 (rs12792912)					
GG	22 (27.2)	32 (29.4)	1.00	(referencia)	
GT	41 (50.6)	50 (45.9)	1.07	(0.51 – 2.24)	0.852
TT	18 (22.2)	27 (24.7)	0.96	(0.40 – 2.28)	0.932
G	85 (52.5)	114 (52.3)			
T	77 (47.5)	104 (47.7)	0.98	(0.63 – 1.51)	0.942
CA6 (rs17032907)					
CC	30 (33.7)	45 (36.6)	1.00	(referencia)	
CT	46 (51.7)	57 (46.3)	1.41	(0.73 – 2.71)	0.302
TT	13 (14.6)	21 (17.1)	0.86	(0.35 – 2.15)	0.761
C	106 (59.6)	147 (59.8)			
T	72 (40.4)	99 (40.2)	1.01	(0.66 – 1.54)	0.951
COL2A1 (rs2276454)					
GG	55 (65.5)	77 (60.6)	1.00	(referencia)	
GA	24 (28.6)	43 (33.9)	0.68	(0.35 – 1.31)	0.251
AA	5 (5.90)	7 (5.50)	0.84	(0.24 – 2.99)	0.800
G	134 (79.8)	197 (77.6)			

A	34 (20.2)	57 (22.4)	0.78	(0.47 – 1.30)	0.353
COL2A1 (rs1793953)					
GG	35 (39.3)	32 (24.6)	1.00	(referencia)	
GA	35 (39.3)	78 (60.0)	0.34	(0.17 – 0.67)	0.002
AA	19 (21.4)	20 (15.4)	0.67	(0.28 – 1.59)	0.364
G	105 (59.0)	142 (54.6)			
A	73 (41.0)	118 (45.4)	0.72	(0.47 – 1.09)	0.126
COL3A1 (rs1800255)					
GG	35 (41.7)	30 (38.0)	1.00	(referencia)	
GA	42 (50.0)	46 (58.2)	1.04	(0.52 – 2.06)	0.906
AA	7 (8.30)	3 (3.80)	2.08	(0.45 – 9.50)	0.342
G	112 (66.7)	106 (67.1)			
A	56 (33.3)	52 (32.9)	1.15	(0.70 – 1.87)	0.568
COL3A1 (rs2138533)					
CC	21 (26.6)	30 (40.5)	1.00	(referencia)	
CT	46 (58.2)	30 (40.5)	2.58	(1.19 – 5.59)	0.016
TT	12 (15.2)	14 (19.0)	1.28	(0.47 – 3.45)	0.623
C	88 (55.7)	90 (60.8)			
T	70 (44.3)	58 (39.2)	1.29	(0.80 – 2.07)	0.291

rs2695					
TT	44 (52.4)	53 (51.0)	1.00	(referencia)	
TC	30 (35.7)	43 (41.3)	0.83	(0.43 – 1.61)	0.596
CC	10 (11.9)	8 (7.70)	1.16	(0.39 – 3.42)	0.787
T	118 (70.2)	149 (71.6)			
C	50 (29.8)	59 (28.4)	0.98	(0.60 – 1.58)	0.938
rs2862					
CC	25 (31.6)	28 (23.1)	1.00	(referencia)	
CT	36 (45.6)	64 (52.9)	0.50	(0.24 – 1.05)	0.069
TT	18 (22.8)	29 (24.0)	0.50	(0.21 – 1.20)	0.125
C	86 (54.4)	120 (49.6)			
T	72 (45.6)	122 (50.4)	0.70	(0.45 – 1.08)	0.113
SAP30L (rs3340)					
TT	21 (25.3)	45 (36.0)	1.00	(referencia)	
TC	44 (53.0)	52 (41.6)	1.66	(0.83 – 3.34)	0.148
CC	18 (21.7)	28 (22.4)	0.96	(0.41 – 2.25)	0.932
T	86 (51.8)	142 (56.8)			
C	80 (48.2)	108 (43.2)	1.02	(0.67 – 1.56)	0.904
CKM (rs4884)					
AA	49 (56.3)	47 (43.9)	1.00	(referencia)	
AG	27 (31.0)	34 (31.8)	0.61	(0.30 – 1.22)	0.166
GG	11 (12.6)	26 (24.3)	0.34	(0.14 – 0.84)	0.019
A	125 (71.8)	128 (59.8)			
G	49 (28.2)	86 (40.2)	0.51	(0.32 – 0.82)	0.005
rs722098					
AA	32 (38.1)	28 (28.0)	1.00	(referencia)	
AG	37 (44.0)	49 (49.0)	0.66	(0.32 – 1.35)	0.260
GG	15 (17.9)	23 (23.0)	0.68	(0.28 – 1.69)	0.419
A	101 (60.1)	105 (52.5)			
G	67 (39.9)	95 (47.5)	0.80	(0.51 – 1.26)	0.348
CA10 (rs203096)					
GG	19 (22.6)	27 (27.5)	1.00	(referencia)	
GT	42 (50.0)	42 (42.9)	1.51	(0.71 – 3.22)	0.281
TT	23 (27.4)	29 (29.6)	1.25	(0.54 – 2.89)	0.601
G	80 (47.6)	96 (49.0)			
T	88 (52.4)	100 (51.0)	1.12	(0.72 – 1.72)	0.607
rs223830					
TT	27 (30.3)	34 (34.7)	1.00	(referencia)	
TC	42 (47.2)	38 (38.8)	1.31	(0.63 – 2.72)	0.465
CC	20 (22.5)	26 (26.5)	1.00	(0.44 – 2.29)	0.982
T	96 (53.9)	106 (54.1)			
C	82 (46.1)	90 (45.9)	1.01	(0.65 – 1.57)	0.941
DRD2 (rs1800498)					
GG	42 (59.1)	61 (55.4)	1.00	(referencia)	
GA	19 (26.8)	38 (34.6)	0.82	(0.39 – 1.70)	0.595
AA	10 (14.1)	11 (10.0)	1.07	(0.38 – 3.00)	0.885
G	103 (72.5)	160 (72.7)			
A	39 (27.5)	60 (27.3)	0.96	(0.57 – 1.60)	0.891
PRKCE (rs2814778)					

TT	68 (89.5)	104 (81.3)	1.00 (referencia)		
TC	8 (10.5)	21 (16.4)	0.61 (0.24 – 1.54)	0.305	
CC	0 (0.00)	3 (2.30)	-	-	-
T	144 (94.7)	229 (89.5)			
C	8 (5.26)	27 (10.5)	0.47 (0.20 – 1.09)	0.082	

OA, pacientes con OA; OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza; Los valores de p significativos se muestran en negrita.

-  Polimorfismos que activan a HIF-1 α
-  Polimorfismos que interactúan con HIF-1 α
-  Polimorfismos inducidos por HIF-1 α
-  Marcadores de ancestría

Análisis por ancestría

En los estudios de casos y controles, y cuando exista el interés de realizar análisis sobre el efecto que pudiera tener la ancestría (como una variable más), bien vale la pena utilizar marcadores con una frecuencia poblacional conocida. En la **Tabla 5** se muestra la distribución del alelo de menor frecuencia (MAF) en el grupo control, grupo de OA, y su comparación con los datos obtenidos de una base pública (proyecto 1000 genomas [Ref. 49]). Además, en la misma tabla se indican las diferencias en frecuencias alélicas (δ) entre poblaciones Africanas, Europeas y Amerindias reportadas previamente [52, 53].

Tabla 5. Distribución del MAF en grupo control, grupo OA y en proyecto 1000 genomas, y su comparación con las principales poblaciones que conforman al mestizo Mexicano.

AIMs ID rs	Nombre del marcador	MAF	Grupo control	Grupo OA	Proyecto 1000 genomas	Afr	Eur	AI	Afr/Eur (δ)	Afr/AI (δ)	Eur/AI (δ)
<i>rs2695</i>	WI-11909	C	0.28	0.29	0.40	0.81	0.86	0.22	0.05	0.59	0.64
<i>rs2862</i>	WI-14319	T	0.50	0.45	0.41	0.38	0.17	0.69	0.21	0.30	0.51
<i>rs3340</i>	WI-17163	C	0.43	0.48	0.48	0.06	0.19	0.65	0.13	0.59	0.47
<i>rs4884</i>	CKM	G	0.40	0.28	0.42	0.15	0.29	0.86	0.13	0.71	0.57
<i>rs722098</i>	TSC0050288	G	0.47	0.39	0.42	0.90	0.18	0.72	0.73	0.19	0.54
<i>rs203096</i>	TSC0745571	T	0.51	0.52	0.50	0.65	0.72	0.28	0.07	0.37	0.44
<i>rs223830</i>	rs223830	C	0.45	0.46	0.40	0.03	0.19	0.64	0.16	0.62	0.45
<i>rs1800498</i>	DRD2-Taq	A	0.27	0.27	0.33	0.14	0.65	0.09	0.51	0.05	0.56
<i>rs2814778</i>	FY-null	C	0.10	0.05	0.03	0.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.00

AIMs=marcadores informativos de ancestría; MAF=alelo de menor frecuencia; OA=osteoartritis; Afr=población Africana; Eur=población Europea; AI=población Amerindia; δ =representa la diferencia de frecuencias alélicas entre los valores de las poblaciones indicadas.

En la **Figura 12** se muestra de manera global la estructura ancestral de los tres principales componentes de las poblaciones analizadas (suma de las dos poblaciones estudiadas, CDMX y de Guadalajara, P1 y P2, respectivamente).

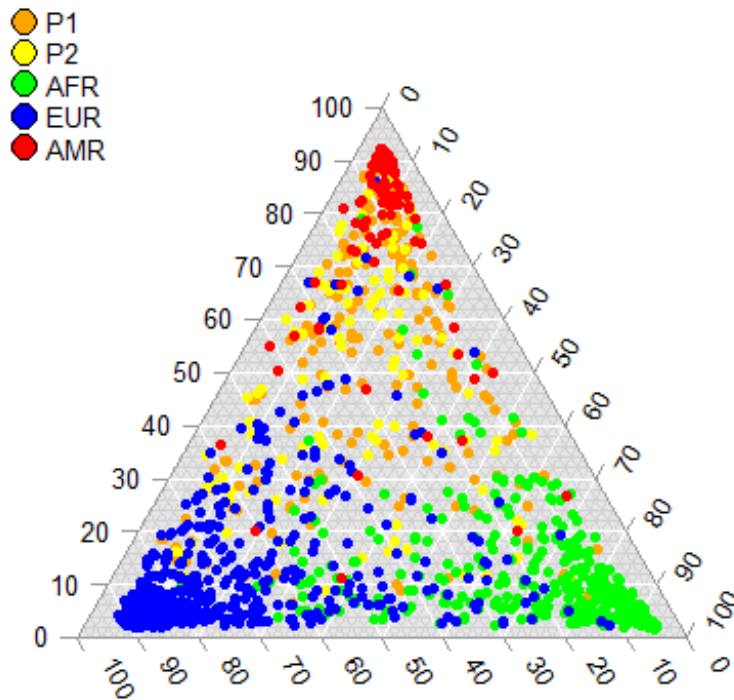


Figura 12. Principales componentes ancestrales de las poblaciones analizadas. AFR, población africana; EUR, población europea; AMR, población amerindia.

Una vez conocida la distribución de los AIMs en nuestro estudio, se ajustaron los resultados por ancestría de los polimorfismos asociados mediante una regresión logística (**Tabla 6**).

Tabla 6. Asociación de los polimorfismos de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes con OA y controles.

Gen	SNP rs ID	OA N (%)	Controles N (%)	OR	(95% CI)	p
<i>AKT2</i>	rs8100018			1.00	Reference	
	GG	70 (58.3)	80 (46.5)	0.91	(0.53 – 1.57)	0.74
	GC	46 (38.3)	61 (35.5)	0.17	(0.05 – 0.55)	0.003
	CC	4 (3.40)	31 (18.0)	1.00	Reference	
	G	186 (77.5)	221 (64.2)	0.58	(0.38 – 0.87)	0.009
	C	54 (22.5)	123 (35.8)			
<i>GSK3B</i>	rs6438552			1.00	Reference	
	AA	37 (35.9)	57 (50.9)	2.28	(1.16 – 4.45)	0.01
	AG	49 (47.6)	34 (30.4)	1.35	(0.58 – 3.11)	0.474
	GG	17 (16.5)	21 (18.7)	1.00	Reference	
	A	123 (59.7)	148 (66.1)	1.37	(0.89 – 2.12)	0.15
	G	83 (40.3)	76 (33.9)			
<i>AGER</i>	rs2070600			1.00	Reference	
	CC	94 (96.9)	179 (84.0)	0.05	(0.00 – 0.47)	0.008
	CT	1 (1.00)	26 (12.2)	0.56	(0.10 – 3.07)	0.50
	TT	2 (2.10)	8 (3.80)	1.00	Reference	
	C	189 (97.4)	384 (90.1)	0.23	(0.08 – 0.64)	0.005
	T	5 (2.60)	42 (9.90)			
<i>HIF1A</i>	rs11549465			1.00	Reference	
	CC	51 (40.5)	105 (67.3)	3.14	(1.82 – 5.42)	0.000
	CT	75 (59.5)	50 (32.0)	-	-	-
	TT	0 (0.00)	1 (0.70)	1.00	Reference	
	C	177 (70.2)	260 (83.3)	2.07	(1.33 – 3.23)	0.001
	T	75 (29.8)	52 (16.7)			
<i>HIF1AN</i>	rs11292			1.00	Reference	
	AA	87 (76.3)	106 (65.4)	0.37	(0.14 – 0.96)	0.04
	AG	9 (7.90)	26 (16.1)	0.90	(0.43 – 1.85)	0.77
	GG	18 (15.8)	30 (18.5)	1.00	Reference	
	A	183 (80.3)	238 (73.5)	0.78	(0.49 – 1.24)	0.30
	G	45 (19.7)	86 (26.5)			
<i>EGLN1</i>	rs1339894			1.00	Reference	
	GG	103 (84.4)	123 (73.6)	1.07	(0.51 – 2.22)	0.85
	GA	18 (14.8)	22 (13.2)	0.05	(0.00 – 0.45)	0.007
	AA	1 (0.80)	22 (13.2)	1.00	Reference	
	G	224 (91.8)	268 (80.2)	0.39	(0.22 – 0.70)	0.001
	A	20 (8.20)	66 (19.8)			
<i>VEGFA</i>	rs1570360			1.00	Reference	
	GG	68 (61.3)	125 (53.0)	0.97	(0.56 – 1.67)	0.92
	GA	38 (34.2)	78 (33.0)	0.31	(0.10 – 0.93)	0.03
	AA	5 (4.50)	33 (14.0)	1.00	Reference	
	G	174 (78.4)	328 (69.5)	0.69	(0.46 – 1.05)	0.08
	A	48 (21.6)	144 (30.5)			
<i>COL2A1</i>	rs1793953			1.00	Reference	
	GG	53 (40.5)	66 (25.5)	0.48	(0.28 – 0.82)	0.008
	GA	54 (41.2)	145 (56.0)	0.67	(0.34 – 1.34)	0.26
	AA	24 (18.3)	48 (18.5)	1.00	Reference	
	G	160 (61.1)	277 (53.5)	0.76	(0.54 – 1.07)	0.11
	A	102 (38.9)	241 (46.5)			
<i>IGF1</i>	rs2288377			1.00	Reference	
	AA	71 (61.2)	176 (75.2)	1.86	(1.08 – 3.20)	0.02
	AT	44 (37.9)	56 (23.9)	1.57	(0.12 – 19.8)	0.72
	TT	1 (0.90)	2 (0.90)	1.00	Reference	
	A	186 (80.2)	408 (87.2)	1.63	(1.01 – 2.63)	0.04
	T	46 (19.8)	60 (12.8)			
<i>IGF1</i>	rs35767			1.00	Reference	
	GG	57 (47.5)	137 (59.8)	2.00	(1.17 – 3.42)	0.01
	GA	55 (45.8)	72 (31.4)	1.43	(0.55 – 3.71)	0.45
	AA	8 (6.70)	20 (8.70)	1.00	Reference	
	G	169 (70.4)	346 (75.5)	1.51	(1.02 – 2.25)	0.03
	A	71 (29.6)	112 (24.5)			

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza; valor de p ajustado por edad, género, IMC y ancestría, en un modelo de regresión logística.

Estratificación por género

Al estratificar por género, se identificaron 3 SNPs asociados significativamente únicamente en el grupo de mujeres. El genotipo CT del polimorfismo *HIF1AN* rs11190613 (OR=0.32, IC 95%=0.11-0.91, p=0.03) y el genotipo GA del polimorfismo *COL2A1* rs1793953 (OR=0.28, IC 95%=0.12-0.68, p=0.005) se asociaron con protección para OA; y tanto el genotipo GA como el alelo A del polimorfismo *IGF1* rs35767 se asociaron con un mayor riesgo de OA (OR=2.55, IC 95%=1.14-5.72, p=0.02, y OR=2.18, IC 95%=1.20-3.96, p=0.01, respectivamente) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Asociación de los polimorfismos de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes con OA y controles estratificados por género.

Gen (SNP rs ID)	Mujeres					Hombres				
	OA N (%)	Controles N (%)	OR	(95% IC)	p	OA N (%)	Controles N (%)	OR	(95% IC)	p
<i>HIF1AN</i> (rs11190613)										
TT	59 (78.7)	43 (62.3)	1.00	Reference		9 (81.8)	17 (80.9)	1.00	Reference	
CT	9 (12.0)	22 (31.9)	0.32	(0.11 – 0.91)	0.03	2 (18.2)	3 (14.3)	1.61	(0.13 – 19.7)	0.70
CC	7 (9.3)	4 (5.8)	0.99	(0.22 – 4.48)	0.99	0 (0.0)	1 (4.8)	-	-	-
T	127 (84.7)	108 (78.3)	1.00	Reference		20 (90.9)	37 (88.1)	1.00	Reference	
C	23 (15.3)	30 (21.7)	0.61	(0.30 – 1.25)	0.18	2 (9.1)	5 (11.9)	0.55	(0.07 – 3.89)	0.55
<i>VEGFA</i> (rs1570360)										
GG	37 (58.7)	39 (52.0)	1.00	Reference		6 (66.7)	16 (48.5)	1.00	Reference	
GA	24 (38.1)	21 (28.0)	1.60	(0.66 – 3.88)	0.29	3 (33.3)	12 (36.4)	0.77	(0.11 – 5.09)	0.79
AA	2 (3.2)	15 (20.0)	0.29	(0.05 – 1.59)	0.15	0 (0.0)	5 (15.1)	-	-	-
G	98 (77.8)	99 (66.0)	1.00	Reference		15 (83.3)	44 (66.7)	1.00	Reference	
A	28 (22.2)	51 (34.0)	0.81	(0.43 – 1.53)	0.53	3 (16.7)	22 (33.3)	0.28	(0.05 – 1.40)	0.13
<i>VEGFA</i> (rs729761)										
GG	62 (81.6)	59 (67.8)	1.00	Reference		10 (90.9)	27 (69.2)	1.00	Reference	
GT	12 (15.8)	26 (29.9)	0.61	(0.25 – 1.48)	0.27	1 (9.1)	10 (25.6)	0.38	(0.03 – 3.91)	0.42
TT	2 (2.6)	2 (2.3)	0.32	(0.03 – 3.21)	0.35	0 (0.0)	2 (5.2)	-	-	-
G	136 (89.5)	144 (82.8)	1.00	Reference		21 (95.5)	64 (82.0)	1.00	Reference	
T	16 (10.5)	30 (17.2)	0.58	(0.27 – 1.24)	0.16	1 (4.5)	14 (18.0)	0.17	(0.01 – 1.51)	0.11
<i>COL2A1</i> (rs1793953)										
GG	32 (41.6)	21 (23.6)	1.00	Reference		3 (27.3)	11 (27.5)	1.00	Reference	
GA	28 (36.4)	54 (60.7)	0.28	(0.12 – 0.68)	0.005	6 (54.5)	23 (57.5)	3.08	(0.41 – 22.6)	0.26
AA	17 (22.0)	14 (15.7)	0.82	(0.27 – 2.43)	0.72	2 (18.2)	6 (15.0)	1.68	(0.13 – 20.5)	0.68
G	92 (59.7)	96 (53.9)	1.00	Reference		12 (54.6)	45 (56.2)	1.00	Reference	

A	62 (40.3)	82 (46.1)	0.80	(0.48 – 1.34)	0.40	10 (45.4)	35 (43.8)	1.43	(0.48 – 4.20)	0.51
COL3A1 (rs2138533)										
CC	20 (28.6)	23 (41.1)	1.00	Reference		1 (11.1)	7 (38.9)	1.00	Reference	
CT	39 (55.7)	23 (41.1)	2.38	(0.96 – 5.86)	0.06	7 (77.8)	7 (38.9)	9.37	(0.40 - 217)	0.16
TT	11 (15.7)	10 (17.8)	1.34	(0.41 – 4.35)	0.62	1 (11.1)	4 (22.2)	1.16	(0.01 – 99.6)	0.94
C	79 (56.4)	69 (61.6)	1.00	Reference		9 (50.0)	21 (58.3)	1.00	Reference	
T	61 (43.6)	43 (38.4)	1.30	(0.74 – 2.27)	0.36	9 (50.0)	15 (41.7)	1.22	(0.27 – 5.47)	0.79
IGF1 (rs35767)										
GG	27 (38.6)	46 (63.0)	1.00	Reference		7 (77.8)	13 (48.2)	1.00	Reference	
GA	37 (52.9)	23 (31.5)	2.55	(1.14 – 5.72)	0.02	2 (22.2)	7 (25.9)	1.19	(0.11 – 12.5)	0.88
AA	6 (8.5)	4 (5.5)	4.15	(0.89 – 19.2)	0.07	0 (0.0)	7 (25.9)	-	-	-
G	91 (65.0)	115 (78.8)	1.00	Reference		16 (88.9)	33 (61.1)	1.00	Reference	
A	49 (35.0)	31 (21.2)	2.18	(1.20 – 3.96)	0.01	2 (11.1)	21 (38.9)	0.18	(0.02 – 1.23)	0.81

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza; valores de p significativos están en negritas.

Estratificación por edad

Cuando se realizó el análisis en grupos clasificados como OA en etapa temprana (≤ 50 años) y en OA en etapa tardía (> 50 años), se observó que tanto el genotipo GT heterocigoto (OR=0.14, IC 95%=0.02-0.96, $p=0.04$) como el alelo T (OR=0.16, IC 95%=0.04-0.66, $p=0.01$) del polimorfismo rs729761 del gen *VEGFA* se asociaron con protección en el grupo de > 50 años; mientras que el genotipo heterocigoto GA del polimorfismo rs1793953 del gen *COL2A1* se asoció con protección (OR=0.32, IC 95%=0.13-0.77, $p=0.01$), pero sólo en el grupo de ≤ 50 años. Por otro lado, el genotipo heterocigoto CT del polimorfismo rs2138533 del gen *COL3A1* (OR=3.03, IC 95%=1.12-8.20, $p=0.02$), y el genotipo GA heterocigoto del polimorfismo rs35767 del gen *IGF1* (OR=2.46, IC 95%=1.02-5.95, $p=0.04$) se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar OA en el grupo de ≤ 50 años (**Tabla 8**).

Tabla 8. Asociación de los polimorfismos de la vía de señalización HIF-1 α en pacientes estratificados por grupos de OA en estadio temprano (≤ 50 años) y OA en estadio tardío (> 50 años).

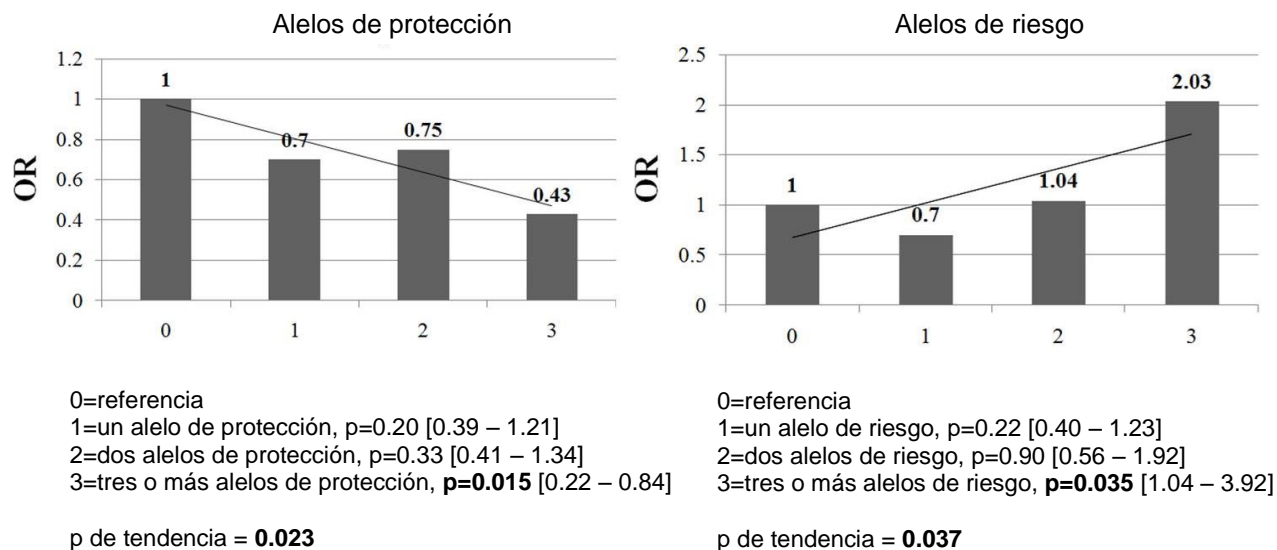
Gen (SNP rs ID)	≤ 50 años					> 50 años				
	OA N (%)	Controles N (%)	OR	(95% IC)	p	OA N (%)	Controles N (%)	OR	(95% IC)	p
<i>HIF1AN</i> (rs11190613)										
TT	43 (79.6)	43 (62.3)	1.00	Reference		25 (78.1)	17 (80.9)	1.00	Reference	
CT	8 (14.8)	22 (31.9)	0.38	(0.14 – 1.05)	0.06	3 (9.4)	3 (14.3)	0.48	(0.05 – 4.31)	0.51
CC	3 (5.6)	4 (5.8)	0.61	(0.10 – 3.66)	0.59	4 (12.5)	1 (4.8)	1.08	(0.07 – 15.9)	0.95
T	94 (87.0)	108 (78.3)	1.00	Reference		53 (82.8)	37 (88.1)	1.00	Reference	
C	14 (13.0)	30 (21.7)	0.51	(0.23 – 1.12)	0.09	11 (17.2)	5 (11.9)	0.82	(0.19 – 3.42)	0.78
<i>VEGFA</i> (rs1570360)										
GG	26 (57.8)	43 (53.1)	1.00	Reference		17 (63.0)	12 (44.4)	1.00	Reference	
GA	18 (40.0)	23 (28.4)	2.08	(0.80 – 5.42)	0.13	9 (33.3)	10 (37.0)	0.47	(0.09 – 2.33)	0.36
AA	1 (2.22)	15 (18.5)	0.17	(0.02 – 1.53)	0.11	1 (3.7)	5 (18.6)	0.27	(0.01 – 4.54)	0.36
G	70 (77.8)	109 (67.3)	1.00	Reference		43 (79.6)	34 (63.0)	1.00	Reference	
A	20 (22.2)	53 (32.7)	0.79	(0.40 – 1.56)	0.50	11 (20.4)	20 (37.0)	0.51	(0.16 – 1.62)	0.25
<i>VEGFA</i> (rs729761)										
GG	43 (81.1)	69 (71.1)	1.00	Reference		29 (85.3)	17 (58.6)	1.00	Reference	
GT	9 (17.0)	27 (27.8)	0.83	(0.32 – 2.13)	0.70	4 (11.8)	9 (31.0)	0.14	(0.02 – 0.96)	0.04
TT	1 (1.9)	1 (1.1)	0.38	(0.01 – 9.51)	0.55	1 (2.9)	3 (10.4)	0.08	(0.00 – 2.23)	0.14
G	95 (89.6)	165 (85.0)	1.00	Reference		62 (91.2)	43 (74.1)	1.00	Reference	
T	11 (10.4)	29 (15.0)	0.78	(0.34 – 1.78)	0.55	6 (8.8)	15 (25.9)	0.16	(0.04 – 0.66)	0.01
<i>COL2A1</i> (rs1793953)										
GG	25 (46.3)	23 (23.2)	1.00	Reference		10 (29.4)	9 (30.0)	1.00	Reference	
GA	18 (33.3)	62 (62.6)	0.32	(0.13 – 0.77)	0.01	16 (47.1)	15 (50.0)	1.04	(0.21 – 4.96)	0.95
AA	11 (20.4)	14 (14.2)	1.19	(0.39 – 3.60)	0.75	8 (23.5)	6 (20.0)	1.15	(0.19 – 6.71)	0.87
G	68 (63.0)	108 (54.6)	1.00	Reference		36 (52.9)	33 (55.0)	1.00	Reference	
A	40 (37.0)	90 (45.4)	0.88	(0.51 – 1.51)	0.64	32 (47.1)	27 (45.0)	1.07	(0.44 – 2.58)	0.87
<i>COL3A1</i> (rs2138533)										
CC	11 (22.0)	23 (40.4)	1.00	Reference		10 (34.5)	7 (41.2)	1.00	Reference	
CT	31 (62.0)	23 (40.3)	3.03	(1.12 – 8.20)	0.02	15 (51.7)	7 (41.2)	2.08	(0.38 – 11.4)	0.39
TT	8 (16.0)	11 (19.3)	1.58	(0.43 – 5.72)	0.48	14 (13.8)	3 (17.6)	1.16	(0.13 – 9.90)	0.89
C	53 (53.0)	69 (60.5)	1.00	Reference		35 (60.3)	21 (61.8)	1.00	Reference	
T	47 (47.0)	45 (39.5)	1.38	(0.76 – 2.50)	0.28	23 (39.7)	13 (38.2)	1.22	(0.41 – 3.60)	0.71
<i>IGF1</i> (rs35767)										
GG	19 (39.6)	45 (58.4)	1.00	Reference		15 (48.4)	14 (60.9)	1.00	Reference	
GA	24 (50.0)	23 (29.9)	2.46	(1.02 – 5.95)	0.04	15 (48.4)	7 (30.4)	1.51	(0.33 – 6.86)	0.58
AA	5 (10.4)	9 (11.7)	1.70	(0.43 – 6.77)	0.44	1 (3.2)	2 (8.7)	2.38	(0.09 – 60.3)	0.59
G	62 (64.6)	113 (73.4)	1.00	Reference		45 (72.6)	35 (76.1)	1.00	Reference	
A	34 (35.4)	41 (26.6)	1.67	(0.90 – 3.08)	0.10	17 (27.4)	11 (23.9)	1.45	(0.47 – 4.46)	0.50

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza; valores de p significativos están en negritas.

Suma de efectos mínimos

Conociendo los nuevos valores de OR, se hizo un análisis de suma de efectos mínimos; es decir, se sumó el efecto independiente de cada alelo para conocer la tendencia de riesgo y protección.

Gráfica 1. Suma de efectos mínimos de polimorfismos con valor de p significativa.



Gráfica 1. Suma de efectos mínimos de los alelos de protección y de riesgo. Cada vez que se suma un alelo (de protección o de riesgo), el efecto biológico es inversamente o directamente proporcional, respectivamente. En el caso de los polimorfismos de protección, tener tres o más alelos, genera mayor protección hacia el desarrollo de OA (p=0.015); en el caso de polimorfismos de riesgo, tener tres o más alelos, genera mayor riesgo de desarrollar OA (p=0.035).

Análisis de haplotipos

Por definición, un haplotipo es un conjunto de alelos de un gen en particular que están estadísticamente asociados. Debido a la herencia en bloque de ciertos alelos o genes, esto permite conocer la co-participación de más de un SNP en el desarrollo de una enfermedad en particular. En este trabajo evaluamos qué haplotipos (de los polimorfismos que resultaron asociados) tienen importancia en el desarrollo de la OA (**Tabla 9**). Debido al diseño en la construcción de

haplotipos, sólo se presentan aquellos que alcanzaron un valor de *N* suficiente para el análisis.

Tabla 9. Análisis de haplotipos de polimorfismos con valor de *p* significativa.

Gen	Haplotipo		OR	IC 95%	p	
<i>HIF1A</i>	rs2057482	rs11549465	rs11549467			
	C	C	G	1.00	Ref	
	C	T	G	2.59	1.36 – 4.94	0.004
<i>IGF1</i>	rs35767	rs228377				
	G	A		1.00	Ref	
	A	A		1.32	0.72 – 2.43	0.35
	A	T		1.69	1.02 – 2.80	0.038

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza; *p*, valor ajustado por ancestría.

Observamos que los haplotipos CTG y AT de los genes *HIF1A* e *IGF1*, respectivamente, se asociaron con riesgo al desarrollo de OA (OR=2.59, *p*=0.004, IC 95%=1.36-4.94; OR=0.21; y *p*=1.69, IC 95%=1.02–2.80, respectivamente).

Interacción gen-gen

La epistasis o epistasia es la interacción entre diferentes genes al expresar un determinado carácter fenotípico; es decir, cuando la expresión de uno o más genes dependen de la expresión de otro gen. Sucede cuando la acción de un gen se ve modificada por la acción de uno o varios genes. Al gen cuyo fenotipo se está expresando se le llama epistático, mientras que al fenotipo alterado o suprimido se le llama hipostático. Este fenómeno puede darse tanto entre genes que segreguen de forma independiente, como entre *loci* que estén ligados; si

bien, en el caso de genes ligados variarán las frecuencias fenotípicas esperadas en la descendencia debido a los efectos de la recombinación. La epistasia y la interacción genética se refieren al mismo fenómeno; sin embargo, la palabra epistasia se usa sobre todo en genética de poblaciones y hace referencia concretamente a las propiedades estadísticas del fenómeno.

La **Tabla 10** resume los resultados del análisis exhaustivo de MDR, que analiza todas las combinaciones posibles de los polimorfismos estudiados. Según el análisis de MDR, el mejor modelo incluye a los polimorfismos *AKT2* (rs8100018) e *IGF1* (rs2288377). Este modelo tiene una prueba de precisión equilibrada de 0.7678, una consistencia de validación cruzada de 10/10 y un valor p de interacción=0.0010. Además, este valor de p también se confirmó a través de modelos de regresión logística, con un valor p de interacción=0.0006.

Tabla 10. Resultados del análisis MDR

Número de locus	Modelo	Training Bal Acc	Testing Bal Acc	Cross-validation consistency	p*	p**
1	COL2A1_rs1793953	0.6044	0.5005	6/10	0.828	0.039
2	AKT2_rs8100018, IGF1_rs2288377	0.7678	0.7678	10/10	0.001	0.0006
3	GSK3B_rs6438552, IGF1_rs35767, COL2A1_rs1793953	0.8086	0.7698	8/10	0.001	0.009

*Valores de p se basaron en 1000 permutaciones

**Valores de p obtenidos por modelos de regresión logística

MDR, multifactor dimensionality reduction; Testing Bal Acc, prueba de precisión equilibrada

La **Figura 13** muestra el mapa de interacción de los polimorfismos estudiados, basado en medidas de entropía entre variables individuales. Se observó un efecto de interacción fuerte entre los polimorfismos rs8100018 (*AKT2*) y rs2288377 (*IGF1*); rs8100018 (*AKT2*) y rs35767 (*IGF1*); rs35767 (*IGF1*) y rs1793953 (*COL2A1*); y entre el rs6438552 (*GSK3B*) y rs35767 (*IGF1*), con valores de información de ganancia de 21.24%, 8.37%, 9.93% y 5.73%, respectivamente.

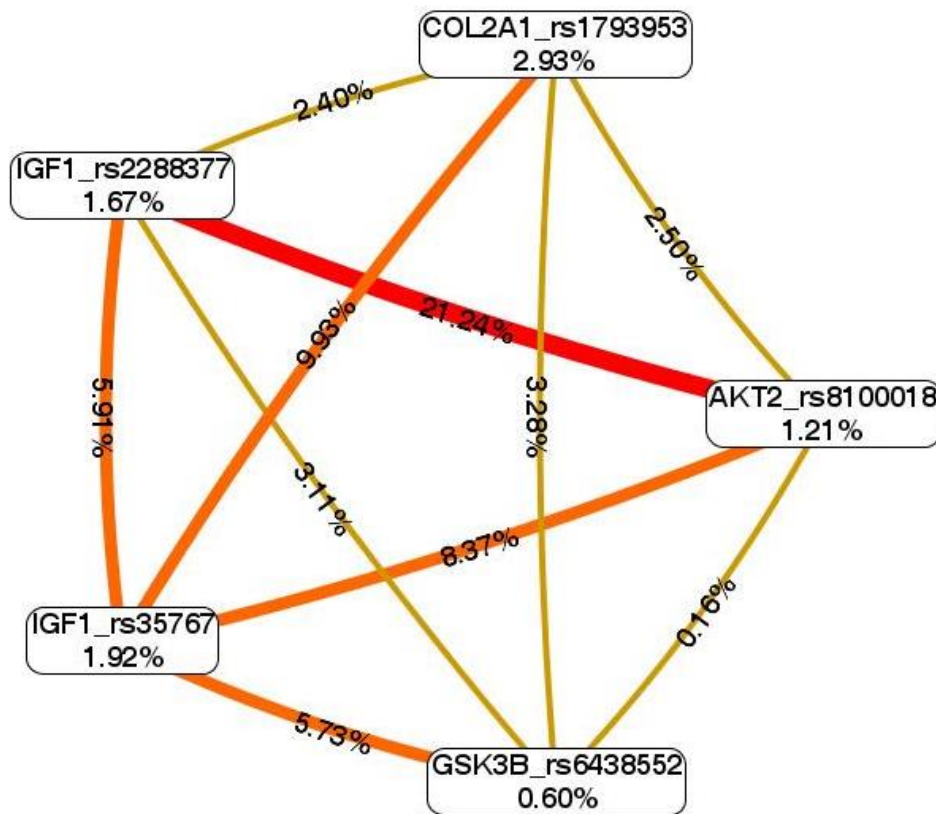
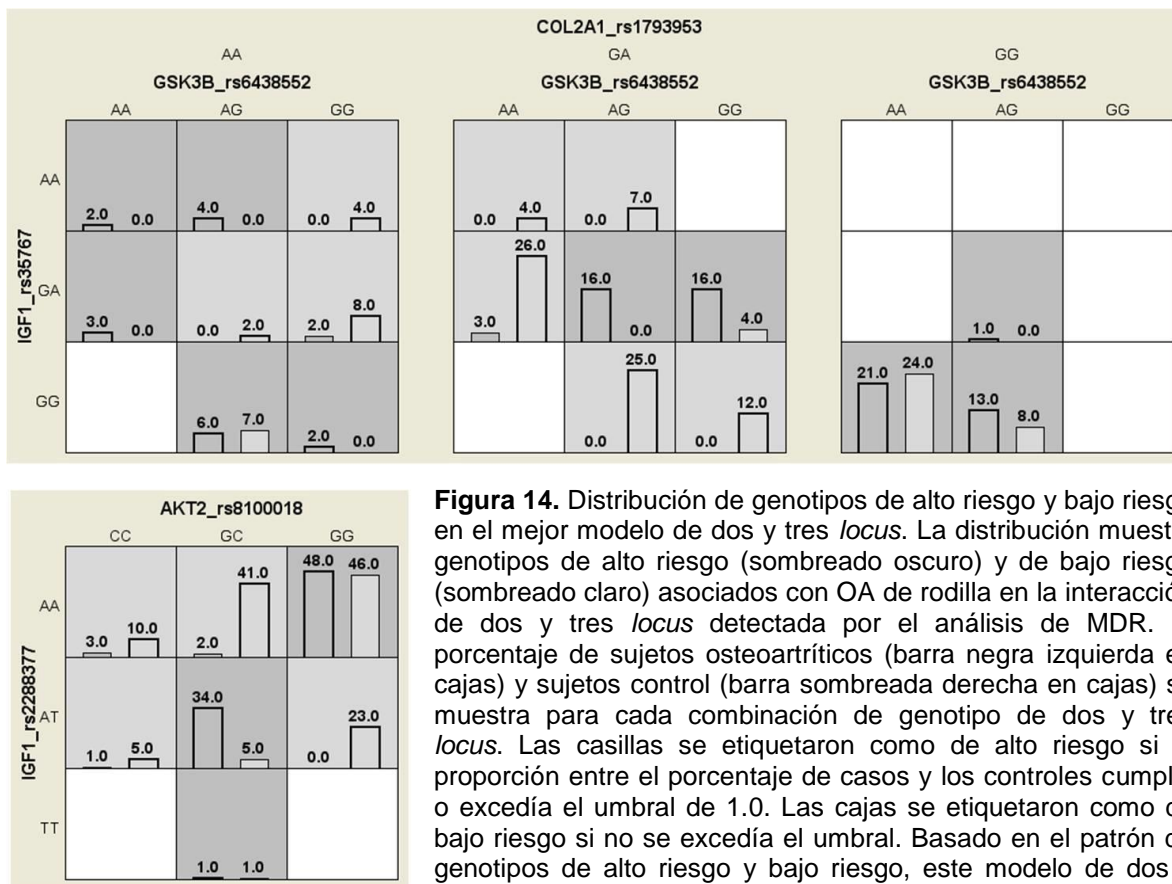


Figura 13. Epistasia de la vía de señalización de HIF-1 α y el riesgo de desarrollar OA. Los valores dentro de los nodos indican ganancia de información (GI) de atributos individuales o efectos principales; mientras que los valores entre nodos muestran GI de combinaciones por pares de atributos o efectos de interacción. La entropía positiva (trazada en rojo o naranja) indica interacción; mientras que la entropía negativa (representada en verde) indica redundancia (o nula interacción).

Asimismo, nuestro modelo nos permitió identificar genotipos de alto riesgo con tres *locus*, *COL2A1* (rs1793953), *GSK3B* (rs6438552) e *IGF1* (rs35767), y los más representativos fueron [GA+AG+GA], OR=indeterminado, [GA+GG+GA], OR=8.0 y [GG+AG+GG], OR=2.5; y genotipos de bajo riesgo [GA+AA+GA], OR=0.23, [GA+AG+GG], OR=indeterminado, y [GA+GG+GG], OR=indeterminado, respectivamente. También identificamos genotipos de alto riesgo con dos *locus*, para *AKT2* (rs8100018) e *IGF1* (rs2288377), [GG+AA], OR=2.08 y [GC+AT], OR=13.6; y genotipos de bajo riesgo [GC+AA], OR=0.09 y [GG+AT], OR=indeterminado, respectivamente (**Figura 14**).



8. DISCUSIÓN

La OA es la más común de las enfermedades articulares la cual resulta en una carga económica importante a los sistemas de salud debido a los costos asociados a la atención médica. La patología de la OA es muy compleja y desde el punto de vista genético, se han realizado diversos estudios con el fin de identificar genes con gran potencial para dianas terapéuticas [61]. Es bien sabido que la patogénesis de OA es multifactorial y su complejidad se debe principalmente a su naturaleza poligénica. Dada esta naturaleza, ha sido difícil probar las interacciones gen-gen asociadas con la OA de rodilla. El método MDR se aplica para identificar las interacciones gen-gen que confieren susceptibilidad a enfermedades comunes, incluidas la hipertensión, el cáncer de vejiga, la diabetes tipo 2 y la artritis reumatoide [62]. Sin embargo, hasta la fecha, solo tres publicaciones han evaluado las interacciones gen-gen mediante MDR en OA de rodilla [59, 63]; y recientemente, el presente trabajo [64]. En este estudio aplicamos el método MDR para evaluar la epistasis de los genes candidatos relacionados con la vía de señalización de HIF-1 α para la susceptibilidad de desarrollo de OA de rodilla en la población adulta mexicana-mestiza.

Nuestros principales hallazgos revelan importantes interacciones gen-gen entre los polimorfismos rs8100018 (*AKT2*), rs1793953 (*COL2A1*), rs2288377 (*IGF1*), rs35767 (*IGF1*), y rs6438552 (*GSK3B*) y el desarrollo de OA de rodilla. El principal mecanismo de regulación en la síntesis de HIF-1 α para traducir señales extracelulares al núcleo, es mediante la unión de factores de crecimiento (como

IGF-1), citocinas (como IL-6) y otros ligandos a receptores tirosina cinasas y G-receptores acoplados a proteínas en la superficie de la célula, que conducen a la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y las vías de MAPK [65-67]; además, la expresión de HIF-1 α está regulada a través de la vía PI3K/AKT, y ambas son importantes en los procesos de supervivencia celular y apoptosis. Especialmente, la apoptosis de condrocitos puede regularse mediante la vía de señalización PI3K/AKT, la cual está estrechamente relacionada con la aparición y desarrollo de osteoartritis, lo que sugiere que la vía de señalización PI3K/AKT puede ser uno de los principales factores que destruyen el cartílago articular [68]. En el presente trabajo, observamos una asociación significativa entre el polimorfismo *AKT2* rs8100018 y el desarrollo de OA de rodilla. Observamos que los portadores tanto del genotipo homocigoto GG como del alelo G menor del polimorfismo rs8100018 muestran una asociación con un menor riesgo de desarrollo de OA. Hasta donde sabemos, los datos sobre las asociaciones entre las variaciones genéticas comunes en el gen *AKT2* y la OA de rodilla son limitados. En patologías como el cáncer de recto, la variante rs8100018 se asocia con un bajo riesgo de cáncer cuando los pacientes son tratados con docetaxel y cetuximab, lo que sugiere que esta variante juega un papel en la expresión de *AKT2* [69]. También es probable que el polimorfismo *AKT2* rs8100018 no sea una variante funcional, sino un marcador sustituto de la variación genética subyacente dentro de esa región genómica. Por lo que se requieren estudios adicionales para identificar el valor pronóstico de la variación de *AKT2* en una cohorte extendida de pacientes y también para conocer con

certeza su impacto en la vía de señalización de HIF-1 α y el desarrollo de OA de rodilla.

Otro polimorfismo que evaluamos en este trabajo fue el rs1793953 del gen *COL2A1*, el cual resultó asociado con protección contra la OA. Se sabe que este gen codifica para la cadena alfa de la colágena tipo II, que es el principal componente de la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular. Mutaciones en el gen *COL2A1* pueden causar un espectro de afecciones autosómicas dominantes raras que podrían afectar la biosíntesis de la colágena normal y provocar el progreso de alguna enfermedad. Por ejemplo, se ha visto que alteraciones en este gen se han asociado con OA de inicio temprano y en otros desórdenes cartilaginosos [70, 71]. Gálvez y *co/s.* analizaron un sitio polimórfico dentro del gen *COL2A1* en pacientes con OA primaria de rodilla, y los resultados en crudo no evidenciaron alguna asociación; sin embargo, cuando estratificaron por grado radiológico, observaron una asociación significativa con los pacientes de grado 4 [72]. Por su parte, Valdes y *co/s.* analizaron el polimorfismo rs1635560 del gen *COL2A1* en pacientes con OA, y encontraron una asociación con disminución de riesgo de desarrollar OA de rodilla, pero únicamente en personas del género masculino (OR=0.68, $p<0.005$) [73]. En tanto que Deng y *co/s.* analizaron la variante rs1793953 del gen *COL2A1* en pacientes con degeneración del disco intervertebral y observaron que los portadores del genotipo AA se asociaron con menor riesgo a la enfermedad (OR=0.51, $p=0.004$) [74]. Cabe destacar que la variante rs1793953 se localiza en un exón,

lo que probablemente influya en los niveles de expresión de su proteína, generando diferentes fenotipos de OA. Serán necesarios estudios adicionales que exploren otras variantes del gen *COL2A1*, incluyendo el polimorfismo rs1635560, y poder dilucidar su participación en la OA.

El factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-1) es un mediador de naturaleza polipeptídica de 70 aminoácidos con un potente efecto anabólico sobre la homeostasis del cartílago. El IGF-1 se expresa en el cartílago, donde puede actuar de forma parácrina y autócrina para estimular la síntesis de MEC e inhibir la degradación de la matriz [75, 76], y tiene una estrecha relación en la expresión de HIF-1 α en condiciones hipóxicas, como ocurre en el cartílago articular [76]. Por lo que respecta al gen *IGF1*, se sabe que participa en la síntesis de MEC por parte de los condrocitos. Por otro lado, la formación de osteofitos y variación en la densidad mineral ósea, se correlacionan positivamente con niveles elevados séricos de IGF-1; adicionalmente, IGF-1 regula la expresión de HIF-1 α . Por lo que respecta a nuestro análisis, pudimos observar que la presencia del polimorfismo rs35767 en este gen confiere riesgo al desarrollo de OA, lo cual se ve soportado con lo reportado por Meulenbelt y cols. [77]. Esto sugiere que variaciones en el gen *IGF1* pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la OA. El polimorfismo rs35767 es del tipo 5'UTR cuya función es regular el proceso de la traducción a través de varias estructuras secundarias que se encuentran en los RNAm, y una de las consecuencias observadas en las variantes tipo 5'UTR es aumentar la actividad transcripcional.

Adicionalmente, evaluamos el polimorfismo rs6438552 del gen *GSK3B* en pacientes con artrosis de rodilla y observamos que los portadores del genotipo AG heterocigótico aumentan el riesgo de OA. Hasta la fecha no hay evidencia científica de que el polimorfismo esté involucrado en la génesis de OA de rodilla y de otras afecciones reumáticas, pero varios estudios sugieren que GSK-3 tiene un papel proinflamatorio basado en los perfiles de citocinas durante su inhibición. Se ha demostrado que la inhibición de GSK-3 mejora la artritis inducida por colágena, y la artritis inducida por anticuerpos de colágena en ratones, lo cual es consistente con un papel proinflamatorio; sin embargo, su actividad puede tener efectos procatabólicos o condroprotectores según el escenario patológico, con importantes implicaciones para el uso propuesto de los inhibidores de GSK-3 como agentes terapéuticos en la artritis [36].

Desde el punto de vista clínico, resultó interesante evaluar los polimorfismos estratificando por género y grupos de edad. Al estratificar por género, encontramos que la asociación se perdió por completo en los hombres, y solo tres polimorfismos (rs11190613 *HIF1AN*, rs1793953 *COL2A1* y rs35767 *IGF1*) permanecieron asociados en las mujeres; incluso, aumentando su significancia. Esto hace suponer que pudieran existir otros factores (probablemente hormonales) que participan en el desarrollo de OA y que se reflejan principalmente en el género femenino.

En cuanto al análisis por edad, y con el fin de aproximarnos con la evolución de la enfermedad, clasificamos a los grupos de estudio en OA de etapa temprana (≤ 50 años) y OA de etapa tardía (> 50 años), y encontramos que el polimorfismo rs729761 del gen *VEGFA* se asoció con protección en el grupo de OA de etapa tardía, incrementado su significancia con respecto al valor global. Se ha demostrado que el *VEGFA* se asocia con el desarrollo de osteofitos [78], y posiblemente el polimorfismo rs729761 desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo de osteofitos. Por otro lado, en el grupo de OA de etapa temprana, el polimorfismo rs1793953 de *COL2A1* incrementó su significancia hacia la protección; en tanto que los polimorfismos rs2138533 de *COL3A1* y rs35767 de *IGF1* incrementaron su significancia hacia el riesgo de desarrollar OA. Estos resultados sugieren que la presencia de estos polimorfismos se relacione con la progresión de la enfermedad; o bien, estar asociada a estados patológicos más o menos severos de la misma.

Para evaluar el efecto de todos los polimorfismos que individualmente se asociaron con la OA de rodilla, se realizó un análisis de suma de efectos mínimos. Este análisis permite saber si existe un incremento en el riesgo o en la protección de desarrollar OA, en tanto el número de alelos asociados aumente, sin importar que sean polimorfismos de distintos genes o cromosomas; a este respecto, pudimos observar claramente la suma de efectos mínimos. El tener tres o más alelos de protección confiere menos de tres veces la posibilidad de desarrollar OA, que el no tener ningún alelo de protección. Lo mismo sucede con

los alelos de riesgo, a partir de tres alelos de riesgo, el efecto sobre el riesgo de padecer OA de rodilla se incrementa de manera significativa.

Por otro lado, el análisis de haplotipos permite evaluar si existen bloques o grupos de polimorfismos que se segregan conjuntamente y que podrían relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. Nuestros resultados muestran que la presencia de los haplotipos CTG y AT de los genes *HIF1A* e *IGF1*, respectivamente, está significativamente asociada ($p < 0.05$) con OA de rodilla (**Tabla 9**), sugiriendo un papel importante en el desarrollo de OA. Se requiere más investigación para apoyar esto.

Finalmente, el análisis de interacción gen-gen (o de epistasis) nos permite conocer si dos polimorfismos actúan de forma sinérgica, antagónica o nula en el riesgo o protección de desarrollar OA. Este análisis permite obtener un valor de p para el efecto de dos polimorfismos y con ello tener evidencia de su participación conjunta en el fenotipo de interés. A diferencia de los análisis por haplotipo y de suma de efectos mínimos, el análisis de interacción gen-gen indica cual combinación de dos polimorfismos tiene un efecto significativo en la susceptibilidad a la enfermedad. Nuestro estudio nos permitió identificar cuatro principales interacciones epistáticas mediante MDR con alto grado de sinergia entre *AKT2*, *IGF1*, *COL2A1* y *GSK3B*. Sin embargo, el grado de interacción de cada polimorfismo puede perderse si los genes se examinan individualmente sin considerar las interacciones potenciales con otros genes, especialmente los de

las vías relacionadas. La evaluación de las interacciones entre genes no solo aumenta la capacidad de detección, sino que también ayuda a comprender la genética detrás de las vías biológicas y bioquímicas subyacentes de la enfermedad [59]. Otro aspecto importante es que con el método MDR, se identificaron genotipos de alto riesgo y bajo riesgo, lo que sugiere un papel esencial de los polimorfismos implicados en la vía de señalización de HIF-1 α en el desarrollo de OA.

Consideramos que el presente estudio tiene fortalezas importantes que valen la pena mencionar. a) La estratificación de la población no fue sesgada como un factor de confusión, dado que incluimos la información sobre el origen étnico de cada participante en los modelos de regresión evaluados por los AIMS; b) Nuestro estudio es el primero en evaluar una gran cantidad de genes relacionados con la vía de señalización HIF-1 α y la OA de rodilla; y c) A diferencia del análisis genético clásico, nuestro enfoque principal destaca la importancia de evaluar de manera integral el efecto de las variantes genéticas en la OA de rodilla.

No obstante, estamos conscientes de las limitaciones del trabajo. Primero, el tamaño de muestra fue reducido; sin embargo, creemos que después de realizar un análisis multivariado y una selección rigurosa de nuestros pacientes y controles, los datos presentados refuerzan la plausibilidad biológica de los SNPs seleccionados en la OA. Segundo, analizamos de manera conjunta a dos

poblaciones, y una de ellas mayoritariamente de la zona metropolitana de la Ciudad de México, por lo que aún estos resultados no podrían generalizarse a otras poblaciones. Tercero, existen otros polimorfismos dentro de los genes que estudiamos que no fueron analizados, por lo que un análisis extendido de los mismos podría aportar mayor información sobre su participación en la OA de rodilla. Por último, existen otras vías de señalización vinculadas a HIF-1 α , como MEK/ERK/MNK que deben explorarse, por lo que su análisis podría proporcionar más información sobre el desarrollo de la OA de rodilla.

9. CONCLUSIONES

Analizamos 42 polimorfismos genéticos de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes con OA de rodilla. En este estudio, identificamos variantes genéticas dentro de los genes *AKT2*, *AGER*, *HIF1AN*, *EGLN1*, *VEGFA* y *COL2A1* asociados a la protección de la OA de rodilla; mientras que *GSK3B*, *HIF1A* e *IGF1* son genes que potencialmente juegan un papel en la fisiopatología de la OA de rodilla en individuos de origen mexicano. La **Figura 15** resume la epistasis de los SNP asociados con OA de la vía de señalización de HIF-1 α . Conocer las interacciones de estos polimorfismos implicados en esta vía podría proporcionar una nueva herramienta para identificar a personas con potencial riesgo de desarrollar OA de rodilla. Además, esto abre la oportunidad de estudiar los mecanismos moleculares de estos genes en el nivel del cartílago articular y ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología de OA, así como para estudiar nuevos objetivos terapéuticos.

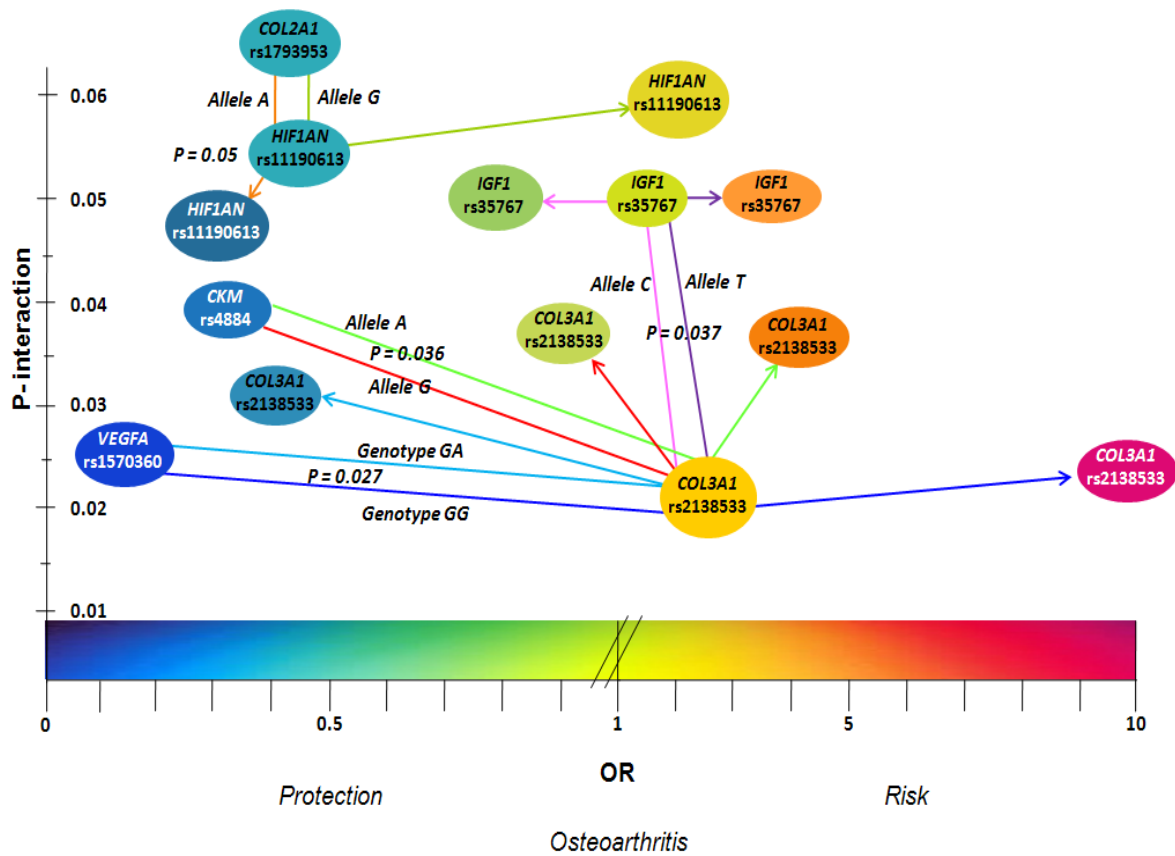


Figura 15. Efecto sinérgico y antagónico de los genotipos y alelos de la vía de señalización de HIF-1 α en pacientes con OA de rodilla. Un genotipo o alelo de un gen interacciona con otro gen, lo cual modifica el valor del OR.

10. REFERENCIAS

- [1] De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munaó F, Trimarchi G, La Torre D, Fichera C, Pappalardo A, Triolo G, Gallo M, Valentini G, Bagnato G. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from "OASIS" study. *Reumatismo*. 2004; 56:169-184.
- [2] Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003; 81:646-656.
- [3] Arden N, Nevitt M. Osteoarthritis: epidemiology 2006; 20:3-25.
- [4] Ksibi Ben Salem I, Saoud Z, Maaoui R, Sbabi R, Metoui L, Rahali Khachlouf H. Epidemiology and clinical profile of knee Osteoarthrosis in elderly patient. *Tunis Med* 2014; 92:335-40.
- [5] Singh AK, Kalaivani M, Krishnan A, Aggarwal PK, Gupta SK. Prevalence of Osteoarthritis of Knee Among Elderly Persons in Urban Slums Using American College of Rheumatology (ACR) Criteria. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:JC09-11. doi: 10.7860/JCDR/2014/7763.4868.
- [6] Ishijima M, Kaneko H, Kaneko K. The evolving role of biomarkers for osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2014; 6:144-53.
- [7] Hunter DJ, Guermazi A, Roemer F, Zhang Y, Neogi T. Structural correlates of pain in joints with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21:1170-1178.
- [8] Vincent HK, Heywood K, Connelly J, Hurley RW. Obesity and weight loss in the treatment and prevention of osteoarthritis. *PM R* 2012; 4:S59-67.

- [9] Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol*. 2018; 30:160-167.
- [10] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2163–96.
- [11] Peláez-Ballesteros I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, Rodríguez-Amado J, Goycochea-Robles MV, Madariaga M, Zamudio J, Santana N, Cardiel MH. Epidemiology of the Rheumatic Disease in Mexico. A Study of 5 regions based on the COPCORD Methodology. *J Rheumatol Suppl* 2011; 86:3-8.
- [12] http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/06_jun_2k10.pdf
- [13] Neogi T, Zhang Y. Osteoarthritis prevention. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23:185-191.
- [14] Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986; 29:1039-1049.
- [15] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological Assessment of Osteo-Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1957; 16:494-502.
- [16] Zhang W, Likhodii S, Zhang Y, Aref-Eshghi E, Harper PE, Randell E, Green R, Martin G, Furey A, Sun G, Rahman P, Zhai G. Classification of osteoarthritis phenotypes by metabolomics analysis. *BMJ Open*. 2014;

4:e006286. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006286.

- [17] Van der Kraan PM. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20(12):1447-50.
- [18] Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*. 2014; 12(1):127-34.
- [19] Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461-8.
- [20] Nazempour A, Van Wie BJ. Chondrocytes, mesenchymal stem cells, and their combination in articular cartilage regenerative medicine. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(5):1325-54.
- [21] López-Armada MJ, Carames B, Cillero-Pastor B, Blanco-García FJ. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Rev Esp Reumatol*. 2004; 31(6):379-93.
- [22] Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors – similar but not identical. *Mol Cells*. 2010; 29(5):435-42.
- [23] Pfander D, Swoboda B, Cramer T. The role of HIF-1alpha in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(1):104.
- [24] Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(2):R34.

- [25] Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1 alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 2001; 15(21):2865-2876.
- [26] Chen N, Chen LP, Zhang J, Chen C, Wei XL, Gul Y, et al. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker. *Gene.* 2012;498(1):81-90.
- [27] Jang MS, Park JE, Lee JA, Park SG, Myung PK, Lee DH, et al. Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(1):209-15.
- [28] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995; 270(3):1230-7.
- [29] Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:3569-3582.
- [30] Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol.* 2005; 90(6):791-7.
- [31] Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008; 15(4):628-34.
- [32] Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2015; 82(3):144–147.
- [33] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; 88(4):1474-80.

- [34] Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1 alpha in osteoarthritis. *Int Orthop*. 2005; 29(1):6-9.
- [35] Murphy CL, Thoms BL, Vaghjiani RJ, Lafont JE. Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(1):213.
- [36] Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* 2007; 27(9):3253-65.
- [37] Rannala B. Finding genes influencing susceptibility to complex diseases in the post-genome era. *Am J Pharmacogenomics*. 2001; 1(3):203-221.
- [38] Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res App*. 2014; 10:264-296.
- [39] Knez K, Spasic D, Janssen KP, Lammertyn J. Emerging technologies for hybridization based single nucleotide polymorphism detection. *Analyst* 2014; 139:353-370.
- [40] Kumar S, Subramanian S. Mutation rates in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 22; 99(2):803-8.
- [41] Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Shukla P, Tiwari S, Purohit R. Computational SNP analysis: current approaches and future prospects. *Cell Biochem Biophys* 2014; 68:233-239.
- [42] Gaffney DJ. Global properties and functional complexity of human gene

- regulatory variation. PLoS Genet 2013; 9: e1003501. doi: 10.1371/journal.pgen.1003501.
- [43] Biesecker LG¹, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. Nat Rev Genet 2013; 14:307-320.
- [44] Aquino-Gálvez A, González-Avila G. El papel del factor inducible de hipoxia (HIF-1 α) en la fibrosis pulmonar idiopática. Neumol Cir Torax. 2010. 69(3).
- [45] Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetic variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:5841-5847.
- [46] Hong JM, Kim TH, Chae SC, Koo KH, Lee YJ, Park EK, Choi JY, Ryoo HM, Kim SY. Association study of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) with osteonecrosis of femoral head in a Korean population. Osteoarthritis Cartilage 2007; 15(6):688-694.
- [47] Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, Ekmecki A. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene and lung cancer. Exp Biol Med 2009; 234:1109-1116.
- [48] Görlach A. Regulation of HIF-1 alpha at the transcriptional level. Curr Pharm Des 2009 ; 15 :3844-3852.
- [49] Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced

- transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003; 24(11):1779-1783.
- [50] <http://browser.1000genomes.org/index.html> (disponible al 16 de mayo de 2018)
- [51] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (disponible al 16 de mayo de 2018).
- [52] Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 2006; 118(5):652-664. Epub 2005 Nov 8. DOI 10.1007/s00439-005-0071-3.
- [53] Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 2004; 68:139-152.
- [54] Moore JH, Andrews PC. Epistasis analysis using Multifactor Dimensionality Reduction, in *Epistasis: Methods and Protocols* 2015 (Humana Press). DOI: 10.1007/978-1-4939-2155-3_16.
- [55] Cho YM, Ritchie MD, Moore JH, Park JY, Lee KU, Shin HD, et al. Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004; 47(3):549-554.
- [56] Gui J, Andrew AS, Andrews P, Nelson HM, Kelsey KT, Karagas MR, et al. A robust multifactor dimensionality reduction method for detecting gene-

- gene interactions with application to the genetic analysis of bladder cancer susceptibility. *Ann Hum Genet* 2011; 75(1):20-28.
- [57] Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 2003; 19(3):376-382.
- [58] Kohli S, Kumar R, Gupta M, Tyagi S, Pasha MA. Impact of interactions between risk alleles on clinical endpoints in hypertension. *Heart Asia* 2016; 8(1):83-89.
- [59] Su SL, Yang HY, Lee HS, Huang GS, Lee CH, Liu WS, et al. Gene-gene interactions between TGF- β /Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis. *BMJ Open* 2015; 5(6):e007931.
- [60] Chung Y, Lee SY, Elston RC, Park T. Odds ratio based multifactor-dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions. *Bioinformatics*. 2007; 23:71-76.
- [61] Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone*. 2012; 51(2):258-264.
- [62] Dai H, Charnigo RJ, Becker ML, et al. Risk score modeling of multiple gene to gene interactions using aggregated-multifactor dimensionality reduction. *BioData Min*. 2013; 6(1):1. doi: 10.1186/1756-0381-6-1.
- [63] Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Espinosa-Morales R. Epistasis between ADIPOQ rs1501299 and PON1 rs662 polymorphisms is potentially associated with the development of knee osteoarthritis. *Mol Biol Rep*. 2019; 46(2):2049-58.

- [64] Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Zamudio-Cuevas Y, et al. Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development. *Clinical Reumatol.* 2019 Jun 25. doi: 10.1007/s10067-019-04635-w. [Epub ahead of print].
- [65] Sartori-Cintra AR, Mara CS, Argolo DL, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics (São Paulo, Brazil).* 2012; 67(1):35-40.
- [66] Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(5-6):993-998.
- [67] Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiol* 2008; 24:97-106.
- [68] Du XA, Wang HM, Dai XX, et al. Role of selenoprotein S (SEPS1) - 105G>A polymorphisms and PI3K/Akt signaling pathway in Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23(2):210-216.
- [69] Peng J, Ma W, Zhou Z, et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict tumor response and disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy and radical surgery. *J Cancer.* 2018; 9(6):1067-1077.
- [70] Snelgrove TA, Peddle LJ, Stone C, Nofball F, Peddle D, Squire D, Rockwood P, Martin R, Tobin Y, Gladney N, Rahman P. Association of COL1A2, COL2A1 and COL9A1 and primary osteoarthritis in a founder population. *Clin Genet.* 2005; 67(4):359-60.

- [71] Williams CJ, Ganguly A, Considine E, McCarron S, Prockop DJ, Walsh-Vockley C, Michels VV. A-2-->G transition at the 3' acceptor splice site of IVS17 characterizes the COL2A1 gene mutation in the original Stickler syndrome kindred. *Am J Med Genet* 1996; 63:461-467.
- [72] Gálvez-Rosas A, González-Huerta C, Borgonio-Cuadra VM, Duarte-Salazar C, Lara-Alvarado L, Soria-Bastida M, Cortés-González S, Ramón-Gallegos E, Miranda-Duarte A. A COL2A1 gene polymorphism is related with advanced stages of osteoarthritis of the knee in Mexican Mestizo population. *Rheumatol Int* 2010; 30:1035-1039.
- [73] Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:137-46.
- [74] Deng Y, Tan XT, Wu Q, Wang X. Correlations between COL2A and aggrecan genetic polymorphisms and the risk and clinicopathological features of intervertebral disc degeneration in a Chinese Han population: A case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017; 21(2):108-115.
- [75] Urano T, Narusawa K, Shiraki M, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008; 33(11):1256-1261.
- [76] Claessen KM, Ramautar SR, Pereira AM, et al. Relationship between insulin-like growth factor-1 and radiographic disease in patients with

primary osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20(2):79-86.

- [77] Meulenbelt I, Bijkerk C, Miedema HS, Breedveld FC, Hofman A, Valkenburg HA, Pols HA, Slagboom PE, van Duijn CM. A genetic association study of the IGF-1 gene and radiological osteoarthritis in a population-based cohort study (the Rotterdam Study). *Ann Rheum Dis* 1998; 57:371-374.
- [78] Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ. Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *J Bone Miner Res*. 2016; 31(5):911-924.

11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	TRIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diseño y compra del arreglo de 128 SNP	X											
Recolección de muestras de casos y controles	X	X	X									
Revisión bibliográfica. Entrega de artículo de revisión publicado.		X										
Presentación de avances ante la CAD			X			X			X			
Presentación de avances ante CT	X	X		X	X		X	X		X	X	
Estandarización del arreglo		X										
Procesamiento de muestras			X	X								
Análisis estadístico de resultados				X	X							
Redacción de artículo				X	X							
Publicación enviada o aceptada							X					
Redacción de tesis				X	X							
Preexamen doctoral											X	
Examen doctoral y disertación pública												X

12. ARTÍCULO ORIGINAL

1. **Fernández-Torres J**, Martínez-Nava GA, Zamudio_Cuevas Y, Martínez-Flores K, Gutiérrez-Ruíz MC, Gómez-Quiroz LE, Garrido-Rodríguez D, Muñoz-Valle JF, Oregón-Romero E, Lozada C, Clavijo-Cornejo, Pineda C, López-Reyes A. Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development. *Clinical Reumatol* 2019 Jun 25. doi: 10.1007/s10067-019-04635-w. [Epub ahead of print]

13. ARTÍCULO DE REVISIÓN

1. **Fernández-Torres J**, Martínez-Nava GA, Gutiérrez-Ruíz MC, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez M. Role of HIF-1 α signaling pathway in Osteoarthritis: a systematic review. *Rev Bras Reumatol* 2016; 57(2):162-173.



Impact of the gene-gene interactions related to the HIF-1 α signaling pathway with the knee osteoarthritis development

Javier Fernández-Torres^{1,2} · Gabriela Angélica Martínez-Nava¹ · Yessica Zamudio-Cuevas¹ · Karina Martínez-Flores¹ · María Concepción Gutiérrez-Ruiz³ · Luis Enrique Gómez-Quiroz³ · Daniela Garrido-Rodríguez⁴ · José Francisco Muñoz-Valle⁵ · Edith Oregón-Romero⁵ · Carlos Lozada⁶ · Denise Clavijo Cornejo⁷ · Carlos Pineda⁷ · Alberto López-Reyes¹

Received: 12 December 2018 / Revised: 3 May 2019 / Accepted: 4 June 2019
© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2019

Abstract

Introduction/objectives Articular cartilage is the target tissue of osteoarthritis (OA), and because it lacks capillary networks, the microenvironment is hypoxic. Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) regulates the homeostasis of this tissue. The aim of this study was to investigate whether genetic polymorphisms of the HIF-1 α signaling pathway are involved in the development of knee OA.

Method We performed a case-control association study and genotyped 134 knee OA patients and 267 healthy controls. All participants were genotyped in order to evaluate 42 SNPs from 22 genes involved in the HIF-1 α signaling pathway using the OpenArray technology. Gene-gene interactions (epistasis) were analyzed using the multifactor dimensionality reduction (MDR) method.

Results The MDR analysis showed epistasis between *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs2288377), *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs35767), *IGF1* (rs35767) and *COL2A1* (rs1793953), and between *GSK3B* (rs6438552) and *IGF1* (rs35767) polymorphisms, with information gain values of 21.24%, 8.37%, 9.93%, and 5.73%, respectively. Additionally, our model allowed us to identify high- and low-risk genotypes among *COL2A1* rs1793953, *GSK3B* rs6438552, *AKT2* rs8100018, and *IGF1* rs35767 polymorphisms.

Conclusions Knowing the interactions of these polymorphisms involved in HIF-1 α signaling pathway could provide a new diagnostic support tool to identify individuals at high risk of developing knee OA.

Keywords Gene-gene interaction · Hypoxia inducible factor-1 α · Multifactor dimensionality reduction · Osteoarthritis · Single nucleotide polymorphism

Introduction

Primary osteoarthritis (OA) is a disorder involving movable joints characterized by cartilage degradation, bone

remodeling, osteophyte formation, joint inflammation, and loss of normal joint function that can culminate in illness [1]. Worldwide estimates indicate that 9.6% of men and 18% of women ≥ 60 years old suffer from symptomatic OA

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10067-019-04635-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alberto López-Reyes
alloreya@yahoo.com

¹ Synovial Fluid Laboratory, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City, Mexico

² Biological and Health Sciences PhD Program, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

³ Health Sciences Department, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

⁴ Center for Research in Infectious Diseases, National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, Mexico

⁵ Departamento de Biología Molecular y Genómica, Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB), Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico

⁶ Rheumatology Service, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City, Mexico

⁷ Musculoskeletal and Rheumatic Diseases Division, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, Mexico City, Mexico

[2–4]. Similar to different ethnic groups, OA is the most common form of human arthritis among Mexicans; its incidence is increasing steadily due to the current demographic, epidemiological, and social transitions along with the pandemic of overweight and obesity in this ethnic group [5].

Articular cartilage is the target tissue of OA, and because it lacks capillary networks, the microenvironment is hypoxic [6]. In physiological conditions, oxygen concentration in articular cartilage varies from 0.5 to 10%. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) plays a fundamental role in maintaining the homeostatic conditions of articular cartilage [7–11]. Under normoxia, its specific proline residues 402 and 564 are hydroxylated in the oxygen-dependent degradation domain by prolyl-hydroxylases (PHDs) to form a complex with the von Hippel-Lindau (VHL) factor; in turn, this complex is subsequently degraded in the proteasome [12, 13]. However, under hypoxic conditions, the activity of PHDs decreases, stabilizing HIF-1 α , which accumulates in the cytoplasm and is phosphorylated by MAPK [11, 14–16]. On the other hand, it has been that the inhibition or depletion of GSK-3 induces HIF-1 α , while the overexpression of GSK-3 β reduces the expression of HIF-1 α [17]. Upon phosphorylation, HIF-1 α translocates to the nucleus and binds to specific DNA sequences (5' TAGCGTGH3') present in promoter regions of genes for their subsequent expression [18, 19]. Among many others, these target genes include *NOS2*, *VEGF*, *EPO*, *GLUT1*, *IGF2*, *SOX9*, and *COL2A1*. Transcription of such target genes has the potential role of maintaining the chondroprotective functions that are challenged by the detrimental conditions occurring in the OA joint environment [20–23].

From a genetic standpoint, several studies suggest associations between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and knee OA [24, 25]. Nevertheless, most of them were assessed individually, in contrast to joint assessments through gene-gene interactions (epistasis), which could provide more information regarding their role [26]. The identification and characterization of gene-gene and gene-environment interactions have been limited primarily due to a lack of powerful statistical methods, and particularly because of small sample sizes, which has been a challenge for geneticists. In this sense, the multifactor dimensionality reduction (MDR) method does not require a model as such, given that no genetic models are assumed, neither is it parametric, as no parameters are estimated [27, 28]. The generalized MDR (GMDR) method is an extension from MDR and allows an adjustment for discrete and quantitative covariables and can be applied to both dichotomous and continuous phenotypes in several study designs based on population [29].

Interactions between multiple *loci* of different genes could be the foundation of the knee OA genetic origin. Therefore, this study is focused on evaluating whether interactions between several genetic variants of HIF-1 α signaling pathway are associated with knee OA in the Mexican population.

Materials and methods

Study design and population

Four hundred and one unrelated Mexican-Mestizo individuals were recruited from September 2013 to September 2016 period for this case control-study. One hundred thirty-four of them were primary knee OA patients: 94 from the Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INRLGII), and 40 from the Rheumatology Department of the Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (Ref. J45703-M CONACYT). The knee OA diagnosis was based on the American College of Rheumatology criteria [30], which included primary OA with any symptoms, and radiographic signs of OA according to the Kellgren-Lawrence (KL) score (≥ 2); the clinical examination and radiographic evaluation were performed by a qualified radiologist-rheumatologist. One hundred and fifty healthy employees from INRLGII and 117 healthy subjects from Guadalajara with no symptoms or signs of knee OA, other types of arthritis, or any painful condition of the joint were recruited as controls. The control subjects were selected among individuals with no personal and family history of OA. Knee radiographs from controls were obtained consecutively to rule out subclinical OA, and those who were grade one or less were considered. Other etiologies causing knee diseases, such as inflammatory arthritis (rheumatoid arthritis -RA- or any other autoimmune disease), post-traumatic or post-septic arthritis, poliomyelitis, and skeletal dysplasia, were excluded. This study meets all criteria contained in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics and Research Committee of the Instituto Nacional de Rehabilitación (Ref. INR-18/13). All participants signed an informed consent letter; additionally, information on age, gender, weight, body mass index (BMI), and birth place was obtained. All participants were > 40 years and were geographically matched (Mexico City and neighboring states), and to have parents and grandparents born in the same geographical region.

SNPs selection and genotyping

Using a case-control design, we sought to assess the contribution of SNPs involved in the HIF-1 α signaling pathway previously reviewed [31]; in addition, we include SNPs that have not been studied in order to know their involvement in OA. A total of 42 SNPs were genotyped in cases and controls and with a population frequency greater than 1% in Mexico population. SNPs selection was supported on information from the <http://browser.1000genomes.org/index.html>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> and http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04066 sources. The selection order of the SNPs was first in promoter regions, followed by exons and introns; also, these SNPs should not be in linkage

disequilibrium (LD). Seven SNPs in genes that activate the HIF-1 α system, 13 SNPs in genes that interact directly with HIF-1 α , and 22 SNPs from genes that are induced by HIF-1 α were selected for this study (Table 1). Since the Mexican-Mestizo population is admixed, ancestry informative markers (AIMs) were used to assess whether any association could be confounded due to population stratification (Table 1). A panel of nine AIMs distinguishing mainly Amerindian, African, and European ancestry ($\delta > 0.44$) were genotyped [32, 33].

Genomic DNA was isolated from peripheral blood white cells using a commercial kit based on the salt fractionation method (QIAmp 96 DNA Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping was performed using the OpenArray technology in a QuantStudio 12 K flex System (Thermo Fisher Scientific). Genomic DNA samples were normalized at 50 ng/ μ l, and 2.5 μ l of DNA were mixed with 2.5 μ l of TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on 384-well plates. Mixes were loaded onto genotyping OpenArray plates previously loaded with the genotyping primers and probes, using the AccuFill System (Thermo Fisher Scientific). Amplification was carried out following the manufacturer's protocol. Results were analyzed using the TaqMan Genotyper v1.2 software.

Statistical analysis

The clinical variables were evaluated with Student's *t* test or Fisher's exact test, when appropriate, and values were expressed as mean \pm SD. Gene and allele frequencies of all polymorphisms were calculated and compared between cases and controls using Fisher's exact test. In order to control the global false positive rate, only SNPs with a statistically significant *p* value on Fisher's exact test were considered in the multivariate analysis. Associations of each SNP with OA risk were assessed with logistic regression models adjusted by age, gender, BMI, and ancestry, taking into account a co-dominant inheritance model for the SNP. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was evaluated by calculating the inbreeding coefficient (F_{is}) using the Genetix v4.05.2 (Université de Montpellier) program with 1000 permutations each *loci* in both study groups.

The ancestry was analyzed by STRUCTURE software v2.3.4 (Pritchard Lab, Stanford University, USA), to evaluate the effect of population stratification on the associations found of each population *k* (*k* = 3) with the genotypes of the nine AIMs mentioned above. This information was included in the logistic regression models to adjust the associations found between the studied polymorphism and OA by individual mix. In addition, we performed a haplotype analysis to determine the joint effect of variants of the same gene on OA development. All the statistical analyses were performed using the statistical package STATA v14.0 (Stata Corp, Texas USA), and considering an $\alpha = 0.05$ significance level.

Finally, in order to study the effect of epistasis, we used the MDR v3.0.2 and GMDR v0.9 statistical packages according the Ritchie's algorithm [27].

Results

Characteristics of the study population

Demographic and clinical characteristics of knee OA patients and controls are shown in Table 2. In the study groups, cases were significantly older than controls individuals ($P < 0.0001$, 51.3 ± 13.5 vs 43.6 ± 11.3 years, respectively). Most of the patients were female in both study groups (88.0% in cases and 70.0% in controls, $P < 0.0001$). The mean BMI of the OA group was significantly higher than the control group ($P < 0.0001$, 29.2 ± 4.8 vs 26.1 ± 4.8 , respectively). There was no difference among patients and controls regarding the place of birth ($P = 0.146$). The distribution of the studied polymorphisms was consistent with HWE except for *HIF1AN* rs11292, *HIF1A* rs11549465, and *EGLN1* rs1339894 polymorphisms (Supplementary Table 1).

Association of SNPs of the HIF-1 α signaling pathway with OA

After adjusting by age, gender, BMI, and admixture in a logistic regression model, the genotype and allele frequencies of ten SNPs significantly associated are presented in Table 3. Genotypes and alleles with low risk against OA were C/C genotype and C allele of *AKT2* rs8100018 (OR = 0.17, 95% CI = 0.05–0.55, $P = 0.003$, and OR = 0.58, 95% CI = 0.38–0.87, $P = 0.009$, respectively), C/T genotype and T allele of *AGER* rs2070600 (OR = 0.05, 95% CI = 0.00–0.47, $P = 0.008$, and OR = 0.23, 95% CI = 0.08–0.64, $P = 0.005$, respectively), A/G genotype of *HIF1AN* rs11292 (OR = 0.37, 95% CI = 0.14–0.96, $p = 0.04$), A/A genotype and A allele of *EGLN1* rs1339894 (OR = 0.05, 95% CI = 0.00–0.45, $P = 0.007$, and OR = 0.39, 95% CI = 0.22–0.70, $P = 0.001$, respectively), A/A genotype of *VEGFA* rs1570360 (OR = 0.31, 95% CI = 0.10–0.93, $p = 0.03$), and G/A genotype of *COL2A1* rs1793953 (OR = 0.48, 95% CI = 0.28–0.82, $P = 0.008$). On the other hand, genotypes and alleles with high risk to development OA were: A/G genotype of *GSK3B* rs6438552 (OR = 2.58, 95% CI = 1.16–4.45, $P = 0.01$), C/T genotype and T allele of *HIF1A* rs11549465 (OR = 3.14, 95% CI = 1.82–5.42, $P = 0.000$, and OR = 2.07, 95% CI = 1.33–3.23, $P = 0.001$, respectively), A/T genotype and T allele of *IGF1* rs2288377 (OR = 1.86, 95% CI = 1.08–3.20, $P = 0.02$, and OR = 1.63, 95% CI = 1.01–2.63, $P = 0.04$, respectively), and G/A genotype and A allele of *IGF1* rs35767 (OR = 2.00, 95% CI = 1.17–3.42, $P = 0.01$, and OR = 1.51, 95% CI = 1.02–2.25, $P = 0.03$, respectively).

Table 1 Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) studied

Gene	db SNP rs ID	Chromosome position	Location	MAF	Most severe consequence
Genes that activate the HIF-1 α system					
<i>PIK3R1</i>	rs3730089	Chr.5:67588148	Intron	A	Missense variant
<i>AKT2</i>	rs8100018	Chr.19:40752023	Intron	C	Intron variant
<i>GSK3B</i>	rs6438552	Chr.3:119631814	Intron	A	Intron variant
<i>IL6</i>	rs1474347	Chr.7:22768124	Exon	C	Non coding transcript
<i>AGER</i>	rs2070600	Chr.6:32151443	Intron	T	Missense variant
<i>AGER</i>	rs1800624	Chr.6:32152387	5' UTR	T	Upstream gene variant
<i>AGER</i>	rs1035798	Chr.6:32151222	Intron	T	Splice region variant
Genes that interact with HIF-1 α					
<i>HIF1A</i>	rs2057482	Chr.14:62213848	3'UTR	T	3'UTR variant
<i>HIF1A</i>	rs11549465	Chr.14:62207557	Exon	T	Pro582Ser
<i>HIF1A</i>	rs11549467	Chr.14:62207575	Exon	A	Ala588Thr
<i>EGLN1</i>	rs12406290	Chr.1:231559226	5'UTR	G	5'UTR variant
<i>EGLN1</i>	rs1339894	Chr.1:231560557	5'UTR	A	5'UTR variant
<i>EGLN1</i>	rs2739513	Chr.1:231515201	Intron	T	Intron variant
<i>EGLN1</i>	rs2009873	Chr.1:231499236	3'UTR	T	Downstream gene variant
<i>VHL</i>	rs779805	Chr.3:10183337	5'UTR	G	5'UTR variant
<i>VHL</i>	rs1678607	Chr.3:10188428	Intron	T	Intron variant
<i>VHL</i>	rs1642742	Chr.3:10191943	3'UTR	G	3'UTR variant
<i>HIF1AN</i>	rs1054399	Chr.10:102312565	3'UTR	T	3'UTR variant
<i>HIF1AN</i>	rs11190613	Chr.10:102313997	3'UTR	C	3'UTR variant
<i>HIF1AN</i>	rs11292	Chr.10:102313607	3'UTR	G	3'UTR variant
Genes induced by HIF-1 α					
<i>VEGFA</i>	rs699947	Chr.6:43736389	5'UTR	A	Upstream gene variant
<i>VEGFA</i>	rs1570360	Chr.6:43737830	5'UTR	A	Upstream gene variant
<i>VEGFA</i>	rs3025039	Chr.6:43752536	3'UTR	T	3'UTR variant
<i>VEGFA</i>	rs729761	Chr.6:43804571	Intergenic	T	Regulatory region variant
<i>EPO</i>	rs1617640	Chr.7:100317298	5'UTR	C	Upstream gene variant
<i>NOS2</i>	rs1060826	Chr.17:26089867	–	T	Synonymous variant
<i>NOS2</i>	rs2297518	Chr.17:26096597	Intron	A	Missense variant
<i>NOS3</i>	rs2070744	Chr.7:150690079	Intron	C	Intron variant
<i>IGF1</i>	rs35767	Chr.12:102875569	5'UTR	A	Upstream gene variant
<i>IGF1</i>	rs2288377	Chr.12:102874762	5'UTR	T	Upstream gene variant
<i>EGF</i>	rs4444903	Chr.4:110834110	5'UTR	A	5'UTR variant
<i>EDN1</i>	rs1800541	Chr.6:12289219	5'UTR	G	Upstream gene variant
<i>EDN1</i>	rs5370	Chr.6:12296255	Exon	T	Lys198Asn
<i>MMP1</i>	rs2239008	Chr.11:102661080	3'UTR	A	3'UTR variant
<i>MMP3</i>	rs679620	Chr.11:102713620	–	G	Coding region
<i>MMP13</i>	rs2252070	Chr.11:102826539	5'UTR	C	Upstream gene variant
<i>MMP13</i>	rs12792912	Chr.11:102801303	–	G	Transversion substitution
<i>CA</i>	rs1703290	Chr.5:4062706	Intergenic	G	Intergenic variant
<i>COL2A1</i>	rs2276454	Chr.12:48376291	–	A	Synonymous variant
<i>COL2A1</i>	rs1793953	Chr.12:48393526	Exon	A	Non coding transcript
<i>COL3A1</i>	rs1800255	Chr.2:189864080	Exon	A	Missense variant
<i>COL3A1</i>	rs2138533	Chr.2:189837212	5'UTR	T	Upstream gene variant
AIMs					
<i>rs2695</i>	rs2695	Chr.9:82884577	Intergenic	T	Intergenic variant
<i>rs2862</i>	rs2862	Chr.15:35145553	5'UTR	C	Upstream gene variant
<i>SAP30L</i>	rs3340	Chr.5:153831867	Intron	C	Intron variant

Table 1 (continued)

Gene	db SNP rs ID	Chromosome position	Location	MAF	Most severe consequence
<i>CKM</i>	rs4884	Chr.19:45810035	–	A	Synonymous variant
<i>rs722098</i>	rs722098	Chr.21:16685598	Intergenic	A	Intergenic variant
<i>CA10</i>	rs203096	Chr.17:50011769	Intron	T	Intron variant
<i>rs223830</i>	rs223830	Chr.16:57451971	3'UTR	C	Downstream gene variant
<i>DRD2</i>	rs1800498	Chr.11:113291588	Intron	A	Intron variant
<i>PRKCE</i>	rs2814778	Chr.1:159174683	5'UTR	C	5'UTR variant

MAF, minor allele frequency; AIMS, ancestry informative markers; Missense variant, a sequence variant that changes one or more bases, resulting in a different amino acid sequence, but where the length is preserved; Intron variant, a transcript variant occurring within an intron; Non coding transcript exon variant, a sequence variant that changes non-coding exon sequence in a non coding transcript; Upstream gene variant, a sequence variant located 5' of a gene; Splice region variant, a sequence variant in which a change has occurred within the region of the splice site, either within 1–3 bases of the exon or 3–8 bases of the intron; Downstream gene variant, a sequence variant located 3' of a gene; Regulatory region variant, a sequence variant located within a regulatory region; Synonymous variant, a sequence variant where there is no resulting change to the encoded amino acid; Intergenic variant, between genes

Evaluation of gene-gene interactions: MDR

Table 4 summarizes the results of exhaustive MDR analysis, which analyzes all possible combinations of the studied polymorphisms. According to the MDR analysis, the best models include the *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs2288377) polymorphisms. This model had a balanced accuracy test of 0.7678, a consistency of cross-validation of 10/10, and an interaction *P* value = 0.0010. Figure 1 shows the interaction map of the studied polymorphisms, based on entropy measures among individual variables. A strong interaction effect was observed between *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs2288377), *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs35767), *IGF1* (rs35767) and *COL2A1* (rs1793953), and between *GSK3B* (rs6438552) and *IGF1* (rs35767) polymorphisms with information gain values of 21.24%, 8.37%, 9.93%, and 5.73%, respectively. The gene-gene interaction of the ten associated polymorphisms is shown in the interaction dendrogram (Supplementary Fig.1). Moreover, our model allowed us to identify interactions in high-risk genotypes of the *COL2A1*

(rs1793953), *GSK3B* (rs6438552), and *IGF1* (rs35767) polymorphisms, and the most representative were (GA + AG + GA), (GA + GG + GA), and (GG + AG + GG), respectively; and low-risk genotypes [(GA + AA+GA), (GA + AG + GG), and (GA + GG + GG)], respectively. Likewise, we identify interactions in high-risk genotypes of the *AKT2* (rs8100018) and *IGF1* (rs2288377) polymorphisms [(GG + AA) and (GC + AT)], respectively; and low-risk genotypes [(GC + AA) and (GG + AT)], respectively (Fig. 2).

Haplotype analysis

In regard to the haplotype analysis, we observed that the CTG (rs2057482, rs11549465, and rs11549467, respectively) and AT (rs35767 and rs228377, respectively) haplotypes of the *HIF1A* and *IGF1* genes, respectively, were found to be associated with an increased risk of developing (OR = 2.59, *P* = 0.004, 95% CI = 1.36–4.94 and OR = 1.69, *P* = 0.038, 95% CI = 1.02–2.80, respectively) (Supplementary Table 2).

Table 2 Characteristics of the study population

Parameter	Total (n = 401)	OA (n = 134)	Controls (n = 267)	<i>P</i>
Age (years)	46.1 ± 12.6	51.3 ± 13.5	43.6 ± 11.3	< 0.0001
BMI (Kg/cm ²)	27.2 ± 5.0	29.2 ± 4.8	26.1 ± 4.8	< 0.0001
Gender				
Female (%)	305 (76.0)	118 (88.0)	187 (70.0)	< 0.0001*
Male (%)	96 (24.0)	16 (12.0)	80 (30.0)	
Place of birth				
Mexico City	192 (47.8)	71 (52.9)	121 (45.3)	0.146*
Others states of Mexico	209 (52.2)	63 (47.1)	146 (54.7)	

Data are expressed as mean ± SD. *P* values were estimated using Student's *t* test, $\alpha = 0.05$; **P* values were estimated using Fisher's exact test, $\alpha = 0.05$. BMI, body mass index, normal, 18.5–24.9; overweight, 25.0–29.9; obesity, ≥ 30.0. Significant *P* values are in italic

Table 3 Association of the HIF-1 α signaling pathway polymorphisms in knee OA patients and controls

Gene	SNP rs ID	OA N (%)	Controls N (%)	OR*	(95% CI)	P
AKT2	rs8100018					
	G/G	70 (58.3)	80 (46.5)	1.00	Reference	
	G/C	46 (38.3)	61 (35.5)	0.91	(0.53–1.57)	0.74
	C/C	4 (3.40)	31 (18.0)	0.17	(0.05–0.55)	0.003
	G	186 (77.5)	221 (64.2)	1.00	Reference	
GSK3B	C	54 (22.5)	123 (35.8)	0.58	(0.38–0.87)	0.009
	rs6438552					
	A/A	37 (35.9)	57 (50.9)	1.00	Reference	
	A/G	49 (47.6)	34 (30.4)	2.28	(1.16–4.45)	0.01
	G/G	17 (16.5)	21 (18.7)	1.35	(0.58–3.11)	0.474
AGER	A	123 (59.7)	148 (66.1)	1.00	Reference	
	G	83 (40.3)	76 (33.9)	1.37	(0.89–2.12)	0.15
	rs2070600					
	CC	94 (96.9)	179 (84.0)	1.00	Reference	
	CT	1 (1.00)	26 (12.2)	0.05	(0.00–0.47)	0.008
HIF1A	TT	2 (2.10)	8 (3.80)	0.56	(0.10–3.07)	0.50
	C	189 (97.4)	384 (90.1)	1.00	Reference	
	T	5 (2.60)	42 (9.90)	0.23	(0.08–0.64)	0.005
	rs11549465					
	C/C	51 (40.5)	105 (67.3)	1.00	Reference	
HIF1AN	C/T	75 (59.5)	50 (32.0)	3.14	(1.82–5.42)	< 0.001
	T/T	0 (0.00)	1 (0.70)	–	–	–
	C	177 (70.2)	260 (83.3)	1.00	Reference	
	T	75 (29.8)	52 (16.7)	2.07	(1.33–3.23)	0.001
	rs11292					
EGLN1	A/A	87 (76.3)	106 (65.4)	1.00	Reference	
	A/G	9 (7.90)	26 (16.1)	0.37	(0.14–0.96)	0.04
	G/G	18 (15.8)	30 (18.5)	0.90	(0.43–1.85)	0.77
	A	183 (80.3)	238 (73.5)	1.00	Reference	
	G	45 (19.7)	86 (26.5)	0.78	(0.49–1.24)	0.30
VEGFA	rs1339894					
	G/G	103 (84.4)	123 (73.6)	1.00	Reference	
	G/A	18 (14.8)	22 (13.2)	1.07	(0.51–2.22)	0.85
	A/A	1 (0.80)	22 (13.2)	0.05	(0.00–0.45)	0.007
	G	224 (91.8)	268 (80.2)	1.00	Reference	
COL2A1	A	20 (8.20)	66 (19.8)	0.39	(0.22–0.70)	0.001
	rs1570360					
	G/G	68 (61.3)	125 (53.0)	1.00	Reference	
	G/A	38 (34.2)	78 (33.0)	0.97	(0.56–1.67)	0.92
	A/A	5 (4.50)	33 (14.0)	0.31	(0.10–0.93)	0.03
COL2A1	G	174 (78.4)	328 (69.5)	1.00	Reference	
	A	48 (21.6)	144 (30.5)	0.69	(0.46–1.05)	0.08
	rs1793953					
	G/G	53 (40.5)	66 (25.5)	1.00	Reference	
	G/A	54 (41.2)	145 (56.0)	0.48	(0.28–0.82)	0.008
COL2A1	A/A	24 (18.3)	48 (18.5)	0.67	(0.34–1.34)	0.26
	G	160 (61.1)	277 (53.5)	1.00	Reference	
	A	102 (38.9)	241 (46.5)	0.76	(0.54–1.07)	0.11

Table 3 (continued)

Gene	SNP rs ID	OA N (%)	Controls N (%)	OR*	(95% CI)	P
<i>IGF1</i>	rs2288377					
	A/A	71 (61.2)	176 (75.2)	1.00	Reference	
	A/T	44 (37.9)	56 (23.9)	1.86	(1.08–3.20)	0.02
	T/T	1 (0.90)	2 (0.90)	1.57	(0.12–19.8)	0.72
	A	186 (80.2)	408 (87.2)	1.00	Reference	
<i>IGF1</i>	T	46 (19.8)	60 (12.8)	1.63	(1.01–2.63)	0.04
	rs35767					
	G/G	57 (47.5)	137 (59.8)	1.00	Reference	
	G/A	55 (45.8)	72 (31.4)	2.00	(1.17–3.42)	0.01
	A/A	8 (6.70)	20 (8.70)	1.43	(0.55–3.71)	0.45
	G	169 (70.4)	346 (75.5)	1.00	Reference	
	A	71 (29.6)	112 (24.5)	1.51	(1.02–2.25)	0.03

OR, odds ratio; CI, confidence interval; OR*, value adjusted for age, sex, BMI, and admixture in a logistic regression model. Significant P values are in italic

Discussion

OA is the most common joint disease, imposing a major economic burden to health systems due to the costs associated with healthcare and disability [34]. Several studies have been performed aimed to identify potential genes of therapeutic targets [35]. It is well-known that knee OA pathogenesis is multifactorial, and its complexity is primarily due to its polygenic nature. Given this polygenic nature, it has been difficult to prove gene-gene interactions associated with knee OA; in this sense, MDR has been applied to identify gene-gene interactions conferring susceptibility to common multifactorial diseases, including hypertension, bladder cancer, type 2 diabetes, and RA [36]. To date, only two published reports have evaluated gene-gene interactions by the MDR method in knee OA, which allow the identification of predictive models for the disease development based on the analyzed pathways (TGF- β /Smad3 and ADIPOQ/PON1) [37, 38]. In the present study, we applied the MDR method to assess the epistasis of genes related to the HIF-1 α signaling pathway due to its central participation in the articular cartilage homeostasis.

Our main findings reveal important gene-gene interactions between the *AKT2*, *IGF1*, *COL2A1*, and *GSK3B* genes and knee OA. HIF-1 α expression is regulated through the PI3K/Akt pathway, and both kinases are important in cell survival and apoptosis; especially, it has been shown that apoptosis of chondrocytes can be regulated by this signaling pathway, which is closely related to the occurrence and development of osteoarthritis [39, 40]. In our study, we observed that the carriers of the G/G homozygous genotype and the G minor allele of the *AKT2* rs8100018 polymorphism showed a significant association with a lower risk to knee OA development. To our knowledge, data on the associations between common genetic variations in *AKT2* gene and knee OA are scarce. But in pathologies such as rectal cancer, it has been observed that the rs8100018 variant is associated with low risk in progress to cancer, suggesting that this variant might play an important role in the *AKT2* function [41].

On the other hand, the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a small 70-amino acid polypeptide mediator with a potent anabolic impact on cartilage homeostasis. IGF-1 is expressed in cartilage, where it can act in a paracrine and autocrine manner to stimulate cartilage extracellular matrix (ECM) synthesis

Table 4 Results of MDR analysis

Locus number	Best model	Training Bal Acc	Testing Bal Acc	Cross-validation consistency	P value*
1	COL2A1_rs1793953	0.6044	0.5005	6/10	0.828
2	AKT2_rs8100018, IGF1_rs2288377	0.7678	0.7678	10/10	0.001
3	GSK3B_rs6438552, IGF1_rs35767, COL2A1_rs1793953	0.8086	0.7698	8/10	0.001

*P values were based on 1000 permutations

MDR, multifactor dimensionality reduction; Testing Bal Acc, testing-balanced accuracy

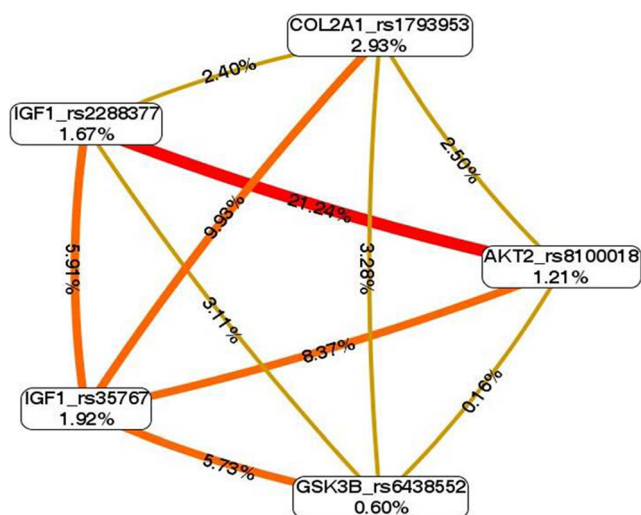


Fig. 1 Interaction map for knee OA risk. The interaction model describes the percentage of the entropy (information gain) that is explained by each factor or two-way interaction. Values inside nodes indicate information gain of individual attributes or main effects, whereas values between nodes show information gain of pairwise combinations of attributes or interaction effects. Positive entropy (plotted in red or orange) indicates interaction, which can be interpreted as a synergistic or nonadditive relationship; while negative entropy (plotted in yellow-green) indicates independence or additivity (redundancy)

as well as inhibit matrix degradation [42, 43], and it has a close relationship in the expression of HIF-1 α under hypoxic conditions such as occurrence in articular cartilage [44]. In our study, we evaluated the rs35767 and rs2288377 polymorphisms of the *IGF1* gene, and we observed that the carriers of the heterozygous genotype and the minor allele in both polymorphisms have higher risk to develop OA. Today, the role of these polymorphisms in the development of OA is not clear. In other pathologies such as osteoporosis, the rs35767 polymorphism has also been associated with risk, especially with low levels of bone mineral density of the femoral neck [45]; however, in the study performed by Chen YC et al., they found that the rs2288377 polymorphism was not associated with osteoporosis risk [46]. In view of these reports, our results may help to elucidate the role that plays the rs35767 and rs2288377 polymorphisms in pathologies that affect the joint and adjacent tissues, but more studies are needed to support it.

Also, we observed that the rs1793953 polymorphism of the *COL2A1* gene was associated with protection against OA. It is known that this gene codifies for the alpha chain of type II collagen, which is the main component of the ECM of the articular cartilage. Alterations in this gene have been associated with OA and early onset family OA, among other cartilage disorders [47]. In the study performed by Gálvez-Rosas et al., they analyzed a polymorphic site in the *COL2A1* gene of primary knee OA patients and observed a significant association with KL grade 4 patients [48]. Moreover, Valdes et al. analyzed the rs1635560 polymorphism of the *COL2A1* gene in OA patients

and found an association with a decrease in knee OA risk, but only among male patients (OR = 0.68, $P < 0.005$) [49]. Deng Y et al. analyzed the rs1793953 polymorphism of the *COL2A1* gene in intervertebral disc degeneration patients, and they found that the carriers of the A/A homozygous genotype and of the A minor allele showed a significant association with a lower risk of developing this disease ($P = 0.004$ and $P = 0.010$, respectively) [50]. The controversy of these results is highly interesting, suggesting for instance a dual role of the gene in the disease, or even a possible interaction with environmental or genetics factors not taken into account in the latter studies. Thus, it is necessary to explore other polymorphic variants in *COL2A1* in our population and elucidate their involvement in OA.

Finally, in the present work, we evaluated the rs6438552 polymorphism of the glycogen synthase kinase-3B (*GSK3B*) gene in knee OA patients, and we observed that the carriers of the heterozygous A/G genotype increase the risk of OA. Several studies have suggested a proinflammatory role for GSK-3 activity based on cytokine profiles during GSK-3 inhibition. GSK-3 inhibition has been demonstrated to ameliorate collagen-induced arthritis and collagen antibody-induced arthritis in mice, which is consistent with a proinflammatory role; however, its activity may have procatabolic or chondroprotective effects depending on the pathologic scenario, with important implications for the proposed use of GSK-3 inhibitors as therapeutic agents in arthritis [51].

The gene-gene interaction analysis allows us to know whether two or more polymorphisms impact OA genetic susceptibility. Our study allowed us to identify gene-gene interactions implemented by MDR with high-degree synergy between *AKT2* and *IGF1* genes (Fig. 1). Examination of these genes in the interaction model reveals a testable hypothesis for further studies; not only does the evaluation of interactions between genes increase the detection capacity, but it also helps to understand the genetics behind the underlying biological and biochemical pathways of the disease. Another important aspect is that with the MDR method, high-risk and low-risk genotypes were identifying in knee OA patients, suggesting an essential role of the polymorphisms involved in HIF-1 α signaling pathway (Fig. 2). Because the MDR method allows the identification of risk predictive models in OA, it can also be used to provide support in preclinical diagnosis; in addition, knowing the mechanisms of interaction, it could help to designed specific therapeutic strategies where several molecular targets should be taken into account for OA.

Finally, the haplotypes analysis makes it possible to evaluate whether there are polymorphism blocks (groups) of a single gene that are jointly segregated and might be linked to the disease development. Our results show that the presence of CTG and AT haplotypes of the *HIF1A* and *IGF1* genes are significantly associated ($P < 0.05$) with knee OA (Supplementary Table 2). The

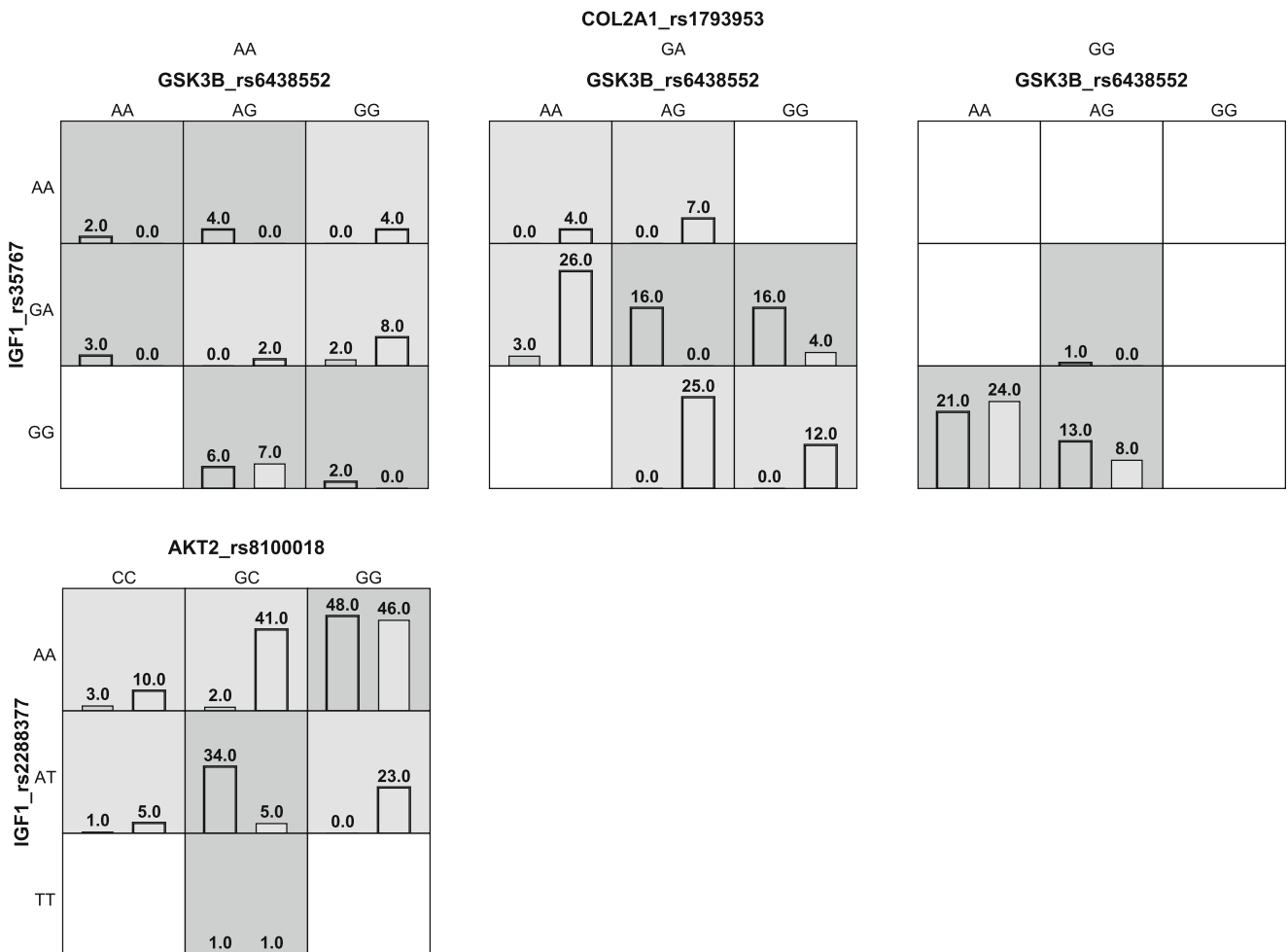


Fig. 2 Distribution of high-risk and low-risk genotypes in the best two- and three-locus model. The distribution shows high-risk (dark shading) and low-risk (light shading) genotypes associated with knee OA in the two- and three-locus interaction detected by MDR analysis. The percentage of osteoarthritic subjects (left black bar in boxes) and control subjects (right hatched bar in boxes) is shown for each two- and three-locus

genotype combination. Boxes were labeled as high-risk if the ratio of the percentage of cases to controls met or exceeded the threshold of 1.0. Boxes were labeled as low-risk if the threshold was not exceeded. Based on the pattern of high-risk and low-risk genotypes, this two- and three-locus model is evidence of gene-gene interaction

data obtained points out the potential role that these genes play in knee OA development.

It is worth mentioning some strengths of our study. a) The population stratification was not biased, given that we included the ethnicity of each participant in the regression models assessed by AIMS; b) our study is the first that evaluated the wide number of genes related to the HIF-1 α signaling pathway among Mexican patients with knee OA; and c) unlike genetic classical analysis, our main approach highlights the importance to evaluate in an integral manner the effect of genetic variants in knee OA.

Yet, it is important to highlight some aspects. We are aware of the limitations of our study; first, our sample size is limited; however, we believe that after performing a multivariate analysis and a rigorous selection of our patients and controls, the presented data reinforce the biological plausibility of the SNPs in the OA. Second, our association study was limited to two

populations, so more studies in different populations are needed to support our findings, as well as to evaluate the functionality of the associated SNPs and be able to show evidence of whether they have a causal effect or not. Finally, there are more variants of the same gene that were not analyzed, as well as other genes of the HIF-1 α signaling pathway that were not considered and whose impact on OA development is unknown.

Conclusions

We analyzed polymorphisms related to the HIF-1 α signaling pathway in Mexican knee OA patients. Knowing the gene-gene interactions of these polymorphisms involved in HIF-1 α signaling pathway could provide a new diagnostic support tool to identify individuals at high risk of developing knee

OA which can serve as a therapeutic target; additionally, a large-scale study to assess HIF-1 α signaling pathway polymorphisms and mechanisms of interaction is needed to clarify the role of HIF-1 α polymorphisms in the pathogenesis of knee OA.

Acknowledgements We thank the support provided by Dr. Gustavo Reyes Terán in facilitating the laboratory where we genotyped the samples.

Compliance with ethical standards Written informed consent was obtained from all participants according to the Declaration of Helsinki and the study protocol was approved by ethics committee of the National Research Centre.

Disclosures None.

References

- Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr Cartil* 23(8):1233–1241
- Arden N, Nevitt M (2006) Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(1):3–25
- De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munaó F, Trimarchi G et al (2004) Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from "OASIS" study. *Reumatismo* 56(3):169–164
- Woolf AD, Pfleger B (2003) Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81(9):646–656
- Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M et al (2011) Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheum Suppl* 86: 3–8
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6):461–468
- Pfänder D, Swoboda B, Cramer T (2006) The role of HIF-1 α in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8(1):104
- Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL et al (2010) Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther* 12(2):R34
- Fernández-Torres J, Hernández-Díaz C, Espinosa-Morales R, Camacho-Galindo J, Galindo-Sevilla NC, López-Macay A et al (2015) Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1 A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord* 16:218
- López-Reyes A, Rodríguez-Pérez JM, Fernández-Torres J, Martínez-Rodríguez N, Pérez-Hernández N, Fuentes-Gómez AJ, Aguilar-González CA, Álvarez-León E, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, Pineda C, Vargas-Alarcón G (2014) The HIF1A rs2057482 polymorphism is associated with risk of developing premature coronary artery disease and with some metabolic and cardiovascular risk factors. The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study. *Exp Mol Pathol* 96(3):405–410
- Zhou J, Hara K, Inoue M, Hamada S, Yasuda H, Moriyama H, Endo H, Hirota K, Yonezawa K, Nagata M, Yokono K (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J Med Sci* 53(6):283–296
- Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K (2014) The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl-hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *Biomed Res Int* 2014: 239356
- Sartori-Cintra AR, Mara CS, Argolo DL, Coimbra IB (2012) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics (São Paulo, Brazil)* 67(1):35–40
- Maxwell PH (2005) Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 90(6):791–797
- Görlach A (2009) Regulation of HIF-1 α at the transcriptional level. *Curr Pharm Des* 15(33):3844–3852
- Semenza GL (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor. *Biochem Pharmacol* 64(5–6):993–998
- Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* 27(9):3253–3265
- Chen N, Chen LP, Zhang J, Chen C, Wei XL, Gul Y, Wang WM, Wang HL (2012) Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker. *Gene* 498(1):81–90
- Patel SA, Simon MC (2008) Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ* 15(4):628–624
- Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88(4):1474–1480
- Pfänder D, Cramer T, Swoboda B (2005) Hypoxia and HIF-1 α in osteoarthritis. *Int Orthop* 29(1):6–9
- Murphy CL, Thoms BL, Vaghjani RJ, Lafont JE (2009) Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair. *Arthritis Res Ther* 11(1):213
- Zhang FJ, Luo W, Lei GH (2015) Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 82(3):144–147
- Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-García V, Blanco FJ (2008) Genetics in osteoarthritis. *Current Genomics* 9(8):542–547
- van Meurs JB, Uitterlinden AG (2012) Osteoarthritis year 2012 in review: genetics and genomics. *Osteoarthr Cartil* 20(12):1470–1476
- Mechanic LE, Luke BT, Goodman JE, Chanock SJ, Harris CC (2008) Polymorphism interaction analysis (PIA): a method for investigating complex gene-gene interactions. *BMC Bioinformatics* 9:146
- Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH (2003) Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet Epidemiol* 24(2):150–157
- Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH (2003) Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 19(3):376–372
- Chen GB, Xu Y, Xu HM, Li MD, Zhu J, Lou XY (2011) Practical and theoretical considerations in study design for detecting gene-gene interactions using MDR and GMDR approaches. *PLoS One* 6(2):e16981
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29(8):1039–1049

31. Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Gutiérrez-Ruiz MA, Gómez-Quiróz LE, Gutiérrez M (2017) Role of hypoxia inducible factor-1 α signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review. *Rev Bras Reumatol Engl Ed* 57(2):162–173. <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2016.07.008>
32. Choudry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL et al (2006) Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 118(5):652–664
33. Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD (2004) Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 68(Pt 2):139–152
34. Contreras-Hernández I, Mould-Quevedo JF, Torres-González R, Goycochea-Robles MV, Pacheco-Domínguez RL, Sánchez-García S et al (2008) Cost-effectiveness analysis for joint pain treatment in patients with osteoarthritis treated at the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS): comparison of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) vs. cyclooxygenase-2 selective inhibitors. *Cost Eff Resour Alloc* 6:21
35. Chapman K, Valdes AM (2012) Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone* 51(2):258–254
36. Dai H, Charnigo RJ, Becker ML, Leeder JS, Motsinger-Reif AA (2013) Risk score modeling of multiple gene to gene interactions using aggregated-multifactor dimensionality reduction. *BioData Min* 6(1):1
37. Su SL, Yang HY, Lee HS, Huang GS, Lee CH, Liu WS, Wang CC, Peng YJ, Lai CH, Chen CY, Lin C, Pan YT, Salter DM, Chen HC (2015) Gene-gene interactions between TGF- β /Smad3 signaling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis. *BMJ Open* 5(6):e007931
38. Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Espinosa-Morales R (2019) Epistasis between ADIPOQ rs1501299 and PON1 rs662 polymorphisms is potentially associated with the development of knee osteoarthritis. *Mol Biol Rep* 46(2):2049–2058
39. Semenza GL (2008) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiol (Bethesda)* 24:97–106
40. Du XA, Wang HM, Dai XX, Kou Y, Wu RP, Chen Q et al (2015) Role of selenoprotein S (SEPS1) -105G>A polymorphisms and PI3K/Akt signaling pathway in Kashin-Beck disease. *Osteoarthr Cartil* 23(2):210–216
41. Peng J, Ma W, Zhou Z, Gu Y, Lu Z, Zhang R, Pan Z (2018) Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict tumor response and disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy and radical surgery. *J Cancer* 9(6):1067–1077
42. Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T et al (2008) Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine (Phila Pa 1976)* 33(11):1256–1261
43. Claessen KM, Ramautar SR, Pereira AM, Smit JW, Biermasz NR, Kloppenburg M (2012) Relationship between insulin-like growth factor-1 and radiographic disease in patients with primary osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthr Cartil* 20(2):79–76
44. Xie Q, Xie J, Zhong J, Cun X, Lin S, Lin Y, Cai X (2016) Hypoxia enhances angiogenesis in an adipose-derived stromal cell/endothelial cell co-culture 3D gel model. *Cell Prolif* 49(2):236–235
45. Wei YK, Ma HL, Guo YZ, Yang BH, Pang WX (2015) Association of the IGF-1 rs35767 and rs972936 polymorphisms with the risk of osteoporosis in a Chinese postmenopausal female population. *Genet Mol Res* 14(4):14325–14330
46. Chen YC, Zhang L, Li EN, Ding LX, Zhang GA, Hou Y, Yuan W (2017) Association of the insulin-like growth factor-1 single nucleotide polymorphisms rs35767, rs2288377, and rs5742612 with osteoporosis risk: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96(51):e9231
47. Snelgrove TA, Peddle LJ, Stone C, Nofball F, Peddle D, Squire D et al (2005) Association of COL1A2, COL2A1 and COL9A1 and primary osteoarthritis in a founder population. *Clin Genet* 67(4):359–360
48. Gálvez-Rosas A, González-Huerta C, Borgonio-Cuadra VM, Duarte-Salazar C, Lara-Alvarado L, Soria-Bastida d l A et al (2010) A COL2A1 gene polymorphisms is related with advanced stages of osteoarthritis of the knee in Mexican Mestizo population. *Rheumatol Int* 30(8):1035–1039
49. Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007) Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56(1):137–146
50. Deng Y, Tan XT, Wu Q, Wang X (2017) Correlations between COL2A and aggrecan genetic polymorphisms and the risk and clinicopathological features of intervertebral disc degeneration in a Chinese Han population: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers* 21(2):108–115
51. Litherland GJ, Hui W, Elias MS, Wilkinson DJ, Watson S, Huesa C, Young DA, Rowan AD (2014) Glycogen synthase kinase 3 inhibition stimulates human cartilage destruction and exacerbates murine osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 66(8):2175–2187

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Review article

Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review



Javier Fernández-Torres^{a,b,*}, Gabriela Angélica Martínez-Nava^a,
María Concepción Gutiérrez-Ruíz^b, Luis Enrique Gómez-Quiroz^b, Marwin Gutiérrez^{a,b}

^a Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Laboratorio de Líquido Sinovial, Mexico City, Mexico

^b Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Programa de Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2016

Accepted 28 April 2016

Available online 5 August 2016

Keywords:

Hypoxia inducible factor-1 α

HIF-1 α signaling pathway

Genetic polymorphisms

Osteoarthritis

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is frequently diagnosed and managed in primary care; it is characterized by loss of articular hyaline cartilage, which is a unique connective tissue that physiologically lacks blood vessels. Articular cartilage survives in a microenvironment devoid of oxygen, which is regulated by hypoxia inducible factor (HIF-1 α). HIF-1 α is considered the main transcriptional regulator of cellular and developmental response to hypoxia. To date, the relevance of HIF-1 α in the assessment of cartilage has increased since its participation is essential in the homeostasis of this tissue. Taking into account the new emerging insights of HIF-1 α in the scientific literature in the last years, we focused the present review on the potential role of HIF-1 α signaling pathway in OA development, especially in how some genetic factors may influence the maintenance or breakdown of articular cartilage.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Papel da via de sinalização do HIF-1 α na osteoartrite: revisão sistemática

RESUMO

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite e frequentemente é diagnosticada e gerenciada na atenção primária; é caracterizada por perda da cartilagem articular hialina, um tecido conjuntivo único que fisiologicamente carece de vasos sanguíneos. A cartilagem articular sobrevive em um microambiente desprovido de oxigênio, que é regulado pelo fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α). O HIF-1 α é considerado o principal regulador transcricional da resposta celular e de desenvolvimento à hipóxia. Na atualidade, a relevância

Palavras-chave:

Fator induzível por hipóxia 1- α

Via de sinalização do HIF-1 α

Polimorfismos genéticos

Osteoartrite

* Corresponding author.

E-mail: javier_astrofan@hotmail.com (J. Fernández-Torres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2016.07.008>

2255-5021/© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

do HIF-1 α na avaliação da cartilagem tem aumentado, já que a sua participação é essencial na homeostase desse tecido. Considerando as novas perspectivas emergentes do HIF-1 α na literatura científica nos últimos anos, foca-se a presente revisão no potencial papel da via de sinalização do HIF-1 α no desenvolvimento da OA, especialmente no modo como alguns fatores genéticos podem influenciar na manutenção ou ruptura da cartilagem articular.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common chronic condition affecting millions of people worldwide and is a considerable cause of disability.¹ It is the most common rheumatic disease, every age can be affected but prevalence increases dramatically with age with a greater incidence in subjects between 40 and 50 years old.²

The joints involved are characterized by a breakdown and loss of articular cartilage that leads to a decrease in the joint space and friction between the bones causing swelling, chronic pain, functional impairment, deformity and disability.³⁻⁶

To date, the hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) has increased its relevance in the assessment of cartilage since its participation is essential in the homeostasis of this tissue.⁷ Articular cartilage is a hypoxic tissue in which HIF-1 α is of pivotal importance for survival and growth of chondrocytes during cartilage development as well as energy generation and matrix synthesis of chondrocytes in both healthy and pathological conditions.^{8,9} By using microarrays, it was also shown that HIF-1 α is expressed in human fetal chondrocytes, which means that this transcription factor is essential for development and maintenance of cartilage.¹⁰

The viability of chondrocytes is compromised by several phenomena such as oxidative stress, inflammatory mediators, biochemical injury and hypoxic conditions. The avascularity of cartilage tissue has allowed establishing well conserved mechanisms where the chondrocytes can survive under such conditions. It is note, that under healthy conditions, oxygen concentration in articular cartilage varies from 0.5 to 10% (~4-70 mm Hg, respectively).^{11,12} When oxygen concentration decreases and environment turns increasingly hypoxic, HIF-1 α plays a critical role to maintain homeostasis, through induction the expression of a variety of genes encoding proteins to increase the availability of oxygen and nutrients to homeostatic levels.^{8,13}

Taking into account of these pieces of information and the recent growing interest in HIF-1 α in rheumatic diseases,^{14,15} we focused the present review on the potential role of HIF-1 α in OA, especially in as some genetic factors may influence in the maintenance or breakdown of articular cartilage.

Methods

Literature review criteria and search strategy

All relevant literature in the field of HIF-1 α and OA, published in the last 15 years was reviewed. The search included original

articles concerning humans and/or animal models published between January 2000 and December 2015. To identify all available studies, a detailed search pertaining to HIF-1 α and OA was conducted according to PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) guidelines.¹⁶ A systematic search was performed in the electronic database (PubMed) using the following Mesh search terms in all possible combinations: "HIF-1 α " or "osteoarthritis" or "articular cartilage" or "HIF-1 α polymorphisms" or "HIF-1 α signaling pathway" or "hypoxia" or "rheumatic diseases", and the combined phrases in order to obtain all genetic studies on the relationship of genetic polymorphisms of HIF-1 α signaling pathway associated with OA. In addition, the reference lists of all retrieved articles were manually reviewed. Two independent authors (JFT and GAMN) analyzed each article and performed the data extraction independently. Discrepancies were resolved by consensus.

Inclusion and exclusion criteria

We excluded from this review the following types of publications: articles not published in English, case reports, clinical trials, and letters to the editor that were purely commentary. Search results were screened to avoid duplicates. Titles, abstracts, and full reports of articles identified were systematically screened with regard to inclusion and exclusion criteria.

Results

To date, it has compiled important information about the role of HIF-1 α in rheumatic diseases. Approximately 5599 publications were identified in PubMed database between January 2000 and December 2015. The results of the search strategy are illustrated in Fig. 1.

General concepts of OA genesis and genetics

In the last years, the knowledge of OA has grown exponentially; however, there are still gaps that have not been possible to address. Currently, cases of OA in very young people are most frequently reported, which gradually induces to change the concept that OA is a disease of elders only. Also, there are very heterogeneous intermediate phenotypes defining the different degrees of severity of OA, since slight crackles of joint, until total loss of articular cartilage. This process is complex, but it is thought that the interaction of biomechanical stress, proinflammatory cytokines, metabolic, environmental, and mainly genetic factors, are the orchestrators that promote the disruption of cartilage homeostasis and initiation of the catabolic pathway.^{6,17-22}

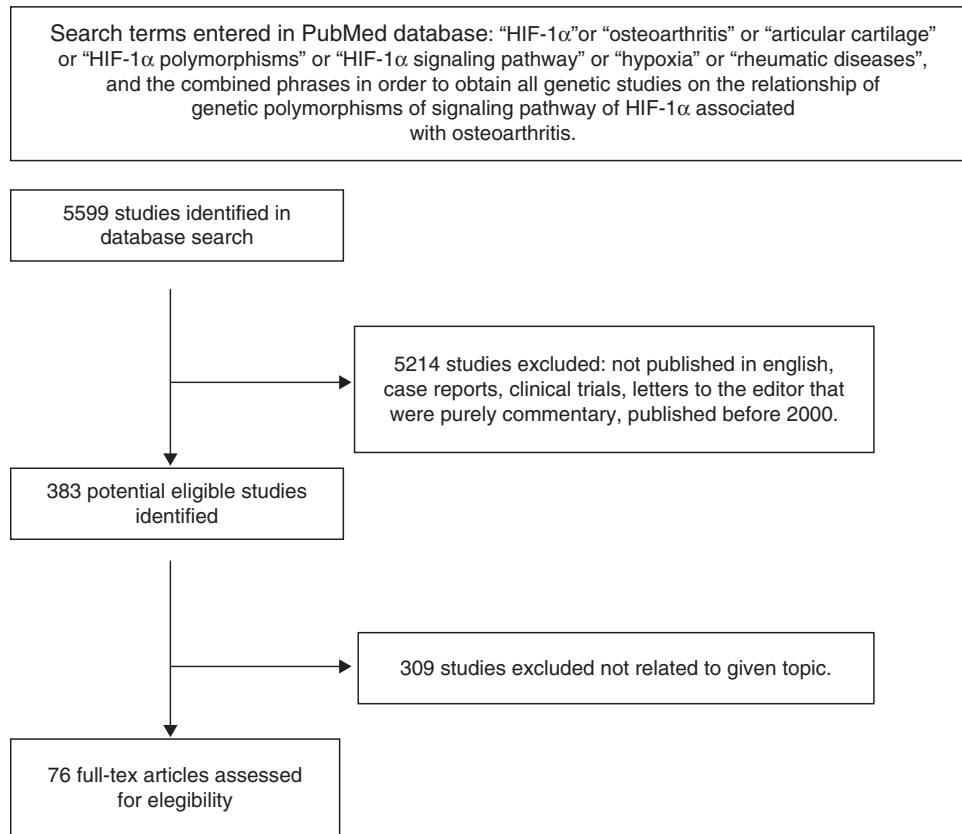


Fig. 1 – Representation of the search strategy.

Although the pathophysiology of OA is not fully characterized, several candidate genes have been reported to be associated with OA susceptibility. Fernández-Moreno et al. determined that despite the multifactorial nature of OA, it not follows the Mendelian inheritance patterns, most likely by the alterations of gene interactions.²⁰ They analyzed different genes located on different chromosomes, and the results revealed the complexity of this field. Table 1 shows some genes and their relationship with the different phenotypes of OA described in this study.

Meulenbelt published a study aimed to determine which signaling pathways were most important to the development of OA.⁶ The most common pathways or genes were the 7q22 locus containing multiple potential genes, the growth differentiation factor5 (*GDF5*) gene, frizzled related protein (*FRZB*) gene, the deiodinase iodothyronine, type II (*DIO2*) gene and the *SMAD3* gene.

The genetic bases in OA can further refine the understanding of the genotype–phenotype relationship, through the presence of single nucleotide polymorphisms (SNP). A genetic polymorphism can be a pivot between a mechanism of resistance or susceptibility in a disease. Genetic polymorphisms that affecting a coding or regulatory sequence and produce major changes in protein structure or mechanism of regulation of expression, can result in different phenotypes.^{23,24} In Table 2 we show some SNPs with phenotypes well established.

Function and structure of articular cartilage

Articular cartilage is a highly specialized tissue of joints; its principal function is to provide a smooth, lubricated surface for articulation and to facilitate the transmission of loads with a low frictional coefficient. Injury to articular cartilage is recognized as a cause of significant musculoskeletal morbidity. The unique and complex structure of articular cartilage makes treatment, and repair or restoration of its defects challenging for the patient, the surgeon, and the physical therapist. The preservation of articular cartilage is highly dependent on maintaining its organized architecture.⁴⁰

Articular cartilage is the primary target tissue in the degenerative process; there are very particular characteristics that make it different from the others, protruding their lack of capillary network. Articular cartilage consists of extracellular matrix (ECM), proteoglycans, chondrocyte, collagen and water; receives its nutrients and oxygen supply by diffusion from the dynamic flow of synovial fluid and subchondral bone. The regulation of metabolism of articular cartilage involves a vast network of signaling pathways that, in the case of OA, the delicate balance between synthesis and degradation of ECM, is strongly affected. Thus, the osteoarthritic process begins with a decreased resistance to extrinsic stress of chondrocytes, along with changes in the activity of proliferation, energy metabolism and response to growth factors.^{41–46} The breakdown of cartilage during the OA pathogenesis is not

Table 1 – Genes associated with the development of OA.

Gene	Chromosome	Phenotypic manifestation
COL2A1, COL11A1, COL11A2	1, 6, 12	Early onset OA
COL9A1	6	Early onset of knee OA
MATN3	2	Early onset of hand and knee OA
COMP	19	Early onset of hip OA hip
COL1A1	17	Reduction of hip OA in women
BMP2	20	Reduction of knee OA in women
TGFB1	19	OA
FRZB, IL4R	2, 16	Hip OA in women
IL1, ASPN, TIMP3	2, 9, 22	Hip and knee OA
IL6	7	Hip OA
AGC1	15	Hand OA
VDR	12	Arthritis in several joints
ERA	6	OA in women
ADAM12, LRCH1, TNA	3, 10, 13	Knee OA
CILP	15	Knee OA in men
CALM1	14	Hip OA in Japanese population
IGF-1	12	Increased risk of OA
IL17	6	Susceptibility to develop OA

Taken and modified from Fernández-Moreno et al.²⁰

only related to the loss of ECM but also chondrocytes death. Chondrocyte death by apoptosis, necrosis, chondroptosis, or combination of these processes has been implicated in the pathogenesis of OA.⁴⁷

The HIF-1 α system

HIF-1 α is a transcriptional factor encoded by the *HIF1A* gene located within chromosome 14q21-24 and is formed by 15

exons; HIF-1 α consists of 826 amino acids and it has a molecular weight of 120kDa.⁴⁸ HIF-1 α is a heterodimer of two chains, alpha chain (regulated by oxygen) and beta chain, both arranged in a double helix (basic helix-loop-helix, bHLH). There are two nuclear localization signal (NLS), but only that found in the C-terminal position it is responsible for the accumulation of HIF-1 α in the nucleus. In the N-terminal region, is located the bHLH and PER-ARNT-SIM A (PAS A) domains, necessary for dimerization and DNA binding through hypoxia response elements (HRE). Finally, the active site of this protein is an oxygen dependent degradation domain (ODDD) that functions as an oxygen sensor (Fig. 2).⁴⁹⁻⁵¹

Under normoxia and in the presence of Fe²⁺ and 2-oxoglutarate, the specific proline residues 402 and 564 are hydroxylated on ODDD domain by prolyl-hydroxylases (PHDs) oxygen dependents, to form a complex with the factor of von Hippel-Lindau (VHL); in turn, this complex binds to ubiquitin (Ub) and it subsequently degraded in the proteasome (Fig. 3).

An external stimulus cellular, as a growth factor that binds to its receptor tyrosine kinase, triggers a cascade of signaling pathways within the cell. For example, vascular endothelial growth factor (VEGF) activates the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (ERK1 and ERK2).⁵² PI3K activates the serine/threonine kinase (AKT), and AKT activates the FKBP12 rapamycin-associated protein, mTOR, RAFT (FRAP), which induces the expression of HIF-1 α .

Under conditions of reduced oxygen (hypoxia), PHDs activity decreases, which stabilizes HIF-1 α and accumulates in the cytoplasm to be phosphorylated by MAPK.⁵³⁻⁵⁵ Once phosphorylated, HIF-1 α it translocates to the nucleus and binds to HIF-1 β subunit (also known as aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT) to form the [HIF-1 α /HIF-1 β] complex. This complex through the HRE, binds to specific DNA sequences 5'TAGCGTGH3' present in promoter regions of genes for subsequent expression.^{47,55,56}

Some of these target genes include nitric oxide synthase 2 (NOS2), vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), some glucose transporters (*GLUT1*, *GLUT3*), Insulin-like growth factor type 2 (*IGF2*), which potentially acts in order to maintain the chondroprotective functions challenged by the detrimental conditions occurring in the OA

Table 2 – Single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with OA processes.

Gene/dbSNP rs Id	Phenotype	First author [Reference]
WISP1 rs2929970	Susceptibility to spinal OA in woman	Urano et al. ²⁵
RAGE rs2070600	Susceptibility to knee OA	Han et al. ²⁶
DVWA rs7639618	Susceptibility to knee OA	Zhang et al. ²⁷
ACE rs4343, rs4362	Susceptibility to knee OA	Qing et al. ²⁸
MATN3 rs8176070	Susceptibility to OA	Gu et al. ²⁹
DIO2 rs225014	Susceptibility to OA	Meulenbelt et al. ³⁰
ADAMTS14 rs4747096	knee OA in woman (Thai population)	Poonpet et al. ³¹
ADAM12 rs1871054	Increased risk of OA	Wang et al. ³² ; Kerna et al. ³³
HIF1A rs11549465	Protective role in the loss of articular cartilage	Fernández et al. ³⁴
IL6 rs1800796	Protective factor for hip and knee OA in the elderly	Fernandes et al. ³⁵
IL16 rs11556218, rs4072111, rs4778889	Decreased knee OA risk	Luo et al. ³⁶ ; Liu et al. ³⁷
GDF5 rs143383	Protective factor for knee OA	Pan et al. ³⁸ ; Tawonsawatruk et al. ³⁹

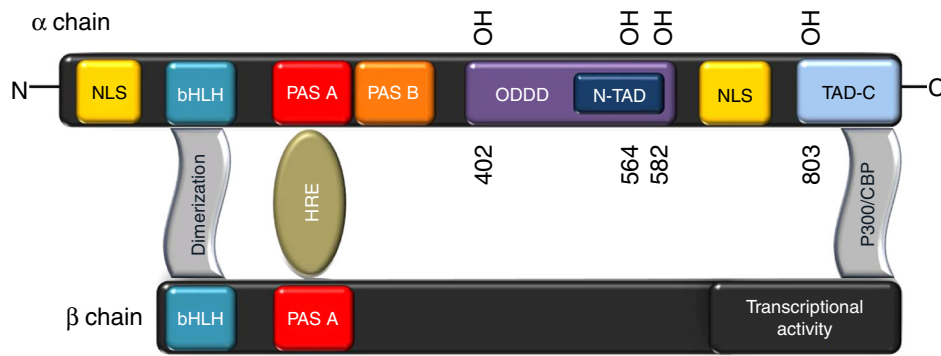


Fig. 2 – Structure of hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α). The NH2-terminal of HIF-1 α and HIF-1 β consists of bHLH (basic helix-loop-helix) and PAS (Per-ARNT-Sim homology) domains that are required for heterodimerization and DNA binding. The COOH-terminal of HIF-1 α (residues 531–826) contains two transactivation domains (TADs). The short half-life of HIF-1 α under nonhypoxic and posthypoxic conditions is due to rapid ubiquitination and proteasomal degradation. HIF-1 α residues 400–600, this region was designated the oxygen-dependent degradation domain (ODDD).

joint environment (Fig. 4).^{8,54-59} This relationship among different genes renders the close relation of HIF-1 α with several pathologies.⁶⁰⁻⁶⁴

HIF-1 α ; (2) proteins that directly interact with HIF-1 α ; and (3) genes driven by HIF-1 α .

Genes that activate HIF-1 α system

Genetic polymorphisms in the HIF-1 α system and their importance in OA

To try to explain simply the interaction of genetic polymorphisms associated with HIF-1 α with importance in OA, we divided this system into three stages: (1) genes that activate

HIF-1 α activation can start by the binding of different proteins to their receptors on the cell membrane; these proteins may be enzymes, growth factors, interleukins or other type molecules; that they can be affected by the presence of genetic polymorphisms which may be associated with the development of OA. Yang et al. analyzed the effect of receptor advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms on susceptibility to

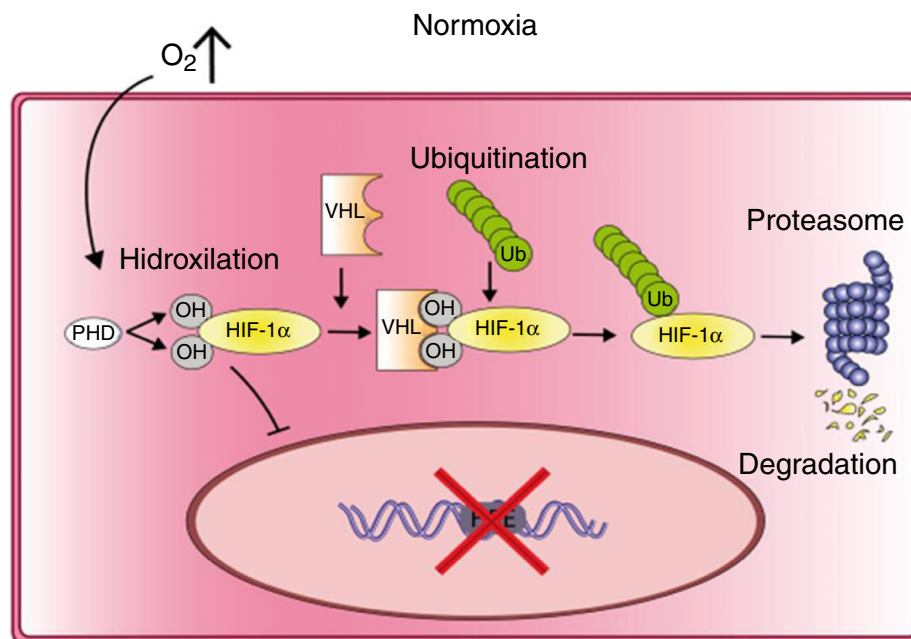


Fig. 3 – HIF-1 α activity under normoxic conditions. Under normoxia conditions, the specific proline residues 402 and 564 on ODDD domain are hydroxylated by oxygen dependent prolyl-hydroxylases (PHDs) that leads to the formation of a complex with the von Hippel-Lindau (VHL) factor; which in turn, binds to ubiquitin (Ub) and is subsequently degraded by the proteasome.

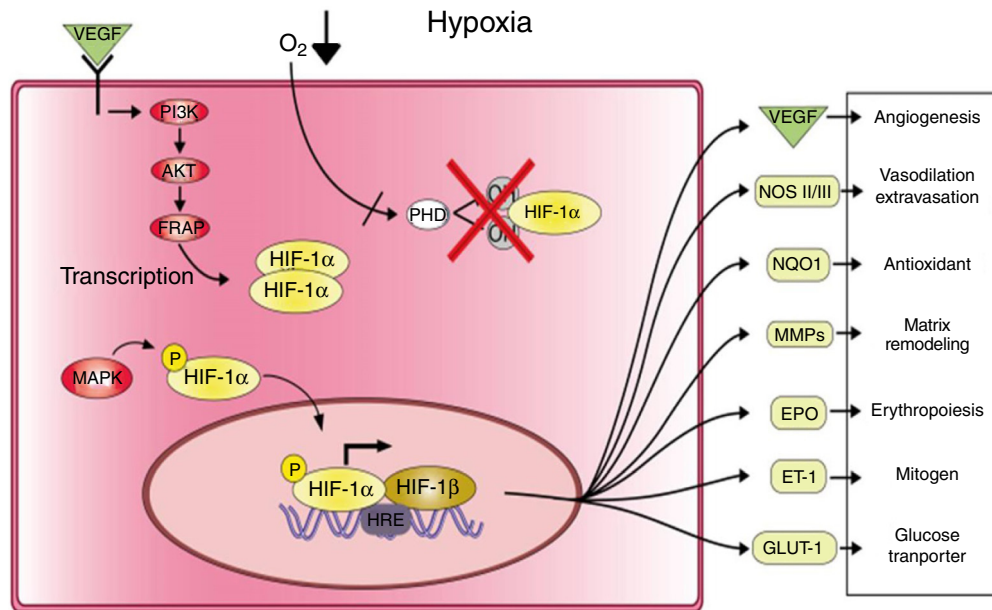


Fig. 4 – HIF-1 α activity under hypoxic conditions. Under hypoxic conditions, HIF-1 α is stabilized and phosphorylated by MAPK; once phosphorylated, HIF-1 α translocates to the nucleus and binds to HIF-1 β subunit to form the [HIF-1 α /HIF-1 β] complex. This complex, through the HRE, binds to specific DNA sequence 5'TAGCGTGH3' present in the promoter regions of several genes for their subsequent activation.

and severity of OA in a Han Chinese population. RAGE participates in regulating inflammation, even in the production of matrix metalloproteinases (MMPs). MMP-1 degrades cartilage, which may result in OA development. They found that two polymorphisms (rs1800625 and rs2070600) in RAGE gene showed a significant association between OA patients and healthy controls (OR=0.42, $p=0.016$, and OR=2.78, $p=0.047$, respectively).⁶⁵ In the study performed by Han et al.,²⁶ they evaluated that the presence of rs2070600 polymorphism in RAGE gene in interaction with obesity, may determine the susceptibility of knee OA.

Swellam et al. reported a potential influence of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism on knee OA risk. IL-1 gene is supposed to be involved in the cartilage destruction process. In this regard, interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) competing with IL-1 for binding to its receptor may act as an inhibitor of cartilage breakdown. They conducted a case-control study with knee OA patients, and concluded that IL-1RN*2 allele represent a significant factor influencing the severity and course of knee OA ($p=0.002$).⁶⁶

Fernandes et al., analyzed the influence of pro-inflammatory cytokine IL-6 with severity and functional status of OA in elderly individuals, and determined that the rs1800796 polymorphism is a protective factor for the presence and severity of hip and knee OA in the elderly. The individuals harboring the C allele have lower prevalence and severity of OA when compared to individuals without this polymorphism.³⁵

Meanwhile, interleukin-16 (IL-16), a pleiotropic cytokine, plays a fundamental role in inflammatory diseases. Liu et al. determined that, compared with the C/C genotype, the C/T

genotype increased the risk of primary knee OA in rs4072111 of IL-16 gene (OR=1.83); however, compared with the T/T genotype, the T/G genotype decreased the risk of primary knee OA in rs11556218 polymorphism (OR=0.37).³⁷ Likewise, Luo et al. evaluated the same polymorphisms and determined the same behavior.³⁶ These results suggest that IL-16 gene polymorphisms are associated with the risk of knee OA.

Finally, there are other genes associated with activation of HIF-1 α , such as PIK3R1, AKT2, GSK3B, IL6, and it will be necessary to explore their genetic variants and to determine their participation in the development of OA.

Proteins that interact directly with HIF-1 α

The stabilization of HIF-1 α in the cytoplasm basically depends on the hydroxylation at specific sites within of the ODDD domain. However, the presence of genetic polymorphisms could alter the structural properties of the transcripts, and this may influence the susceptibility or resistance to diseases, such as was analyzed by Uchanchka et al. in autoimmune diseases associated with HLA-B*27 allele.⁶⁷

In 2003 Tanimoto et al. demonstrated that the substitution of proline by serine in the 582 (P582S) position, due to the presence of single nucleotide polymorphism (rs11549465) within HIF1A gene, enhances its transcriptional activity,⁵⁶ due to an alteration in the characteristics and properties of the binding sites with the target genes.^{67,68} Recently, our group evaluated the presence of this polymorphism in samples of patients with OA, finding that was associated positively as a protective factor in cartilage loss (CT genotype OR=0.2, $p=0.003$,

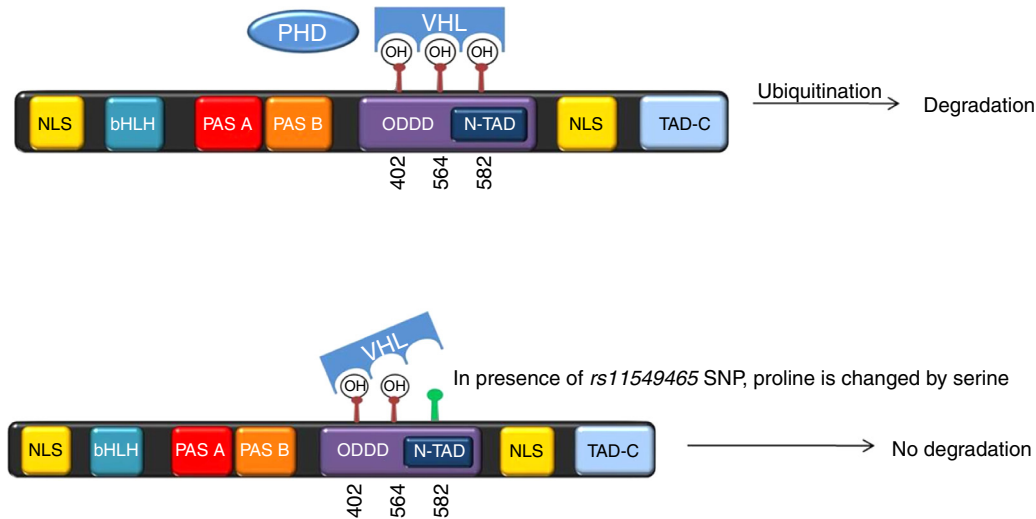


Fig. 5 – The presence of rs11549465 polymorphism, generates a change of proline by serine, which confers greater stability to the HIF-1 α protein due to poor interaction between VHL and hydroxylation sites within the ODDD.

or T allele OR=0.2, $p=0.004$).³⁴ This phenomenon may be explained by the fact that the presence of this polymorphism confers greater stability to the HIF-1 α protein due to poor interaction between VHL and hydroxylation sites within the ODDD (Fig. 5).

Other polymorphism medically important, with increased transcriptional activity within *HIF1A* gene that also was tested by Tanimoto et al., is Ala588Thr (*rs11549467*). Similarly, we evaluate this polymorphism in patients with OA, but did not find him associated. However, this opens the possibility to be evaluated in other populations in order to better understand their influence in OA.

Additionally, it have been described polymorphisms for *EGLN1* (also known as PHD2, prolyl-hydroxylase 2), *VHL* and *HIF1AN* (*HIF1A* inhibitor factor) genes interacting directly with HIF-1 α , but not have been evaluated in OA and that may be of clinical importance in this disease. Some studies in rheumatoid arthritis (RA) demonstrated the expression and regulation of prolyl hydroxylase domain (PHD) enzymes and factor-inhibiting HIF-1 α (FIH-1), which regulate cellular HIF-1 α levels. It is known that RA is characterized by hypoxia and the expression of hypoxia-inducible transcription factors (HIFs), which coordinate cellular responses to hypoxia. Muz et al. conducted this study in RA fibroblast-like synoviocytes, and concluded that PHD-2 is the major hydroxylase regulating HIF levels and the expression of angiogenic genes in arthritic cells. PHD-2 appears to regulate responses relevant to arthritis via HIF- α , highlighting the major importance of this enzyme in hypoxia- and angiogenesis-dependent inflammatory diseases.⁶⁹ This makes us suppose that the presence of genetic polymorphisms of these genes may affect the stability of HIF-1 α contributing importantly in the OA disease.

Genes driving by HIF-1 α

OA chondrocytes are metabolically active, displaying increased synthesis of type II collagen. In comparison with

healthy cartilage, OA articular chondrocytes exhibit increased *in vivo* synthesis of collagen prolyl-4-hydroxylase type II, a pivotal enzyme in collagen triple helix formation.⁷⁰ Once stabilized HIF-1 α in the cytoplasm, several downstream genes are expressed in order to restore multiple components of the extracellular matrix. The presence of genetic polymorphisms in these genes may alter the function of specific proteins that restore joint tissues, promoting the development of OA.

Raine et al. performed an allelic expression analysis of the OA susceptibility gene *COL11A1* in human joint tissues. By using RNA from OA cartilage of individuals undergoing elective joint replacement for OA of the hip (total hip replacement, THR) or of the knee (total knee replacement, TKR), they observed a significant allelic expression imbalance (AEI) at *rs1676486* ($p < 0.0001$) with the T-allele correlating with reduced *COL11A1* expression. AEI at *rs1676486* is a risk factor for lumbar disk herniation, but not for OA.⁷¹

Rodríguez-Fontenla et al. conducted a meta-analysis of nine GWAS to assess candidate genes for association with OA, and only 2 of the 199 candidate genes (*COL11A1* and *VEGF*) were associated with OA in the meta-analysis. Two polymorphisms in *COL11A1* gene (*rs4907986* and *rs1241164*) showed association with hip OA in the combined analysis (OR = 1.12, $p = 1.29 \times 10^{-5}$, and OR = 0.82, $p = 1.47 \times 10^{-5}$, respectively); and the *rs4908291* with the sex stratified analysis in women only (OR = 0.87, $p = 1.29 \times 10^{-5}$). Other polymorphism in *VEGF* gene (*rs833058*) showed association with hip OA in men only (OR = 0.85, $p = 1.35 \times 10^{-5}$).⁷²

The oxygen and nutrients supply to articular cartilage is by diffusion from the synovial fluid. The role of vascular endothelium growth factor (VEGF) is critical for angiogenesis in subchondral bone.⁸ There are only few studies related with gene variants of VEGF gene that may contribute to the development and progress of OA.

Sánchez et al. evaluated two polymorphisms of VEGF gene, -460T/C and +405C/G, in patients with knee OA and compared

with healthy controls, but did not find association.⁷³ Yuan et al. conducted a meta-analysis to order understand the relationship between the pathogenesis of OA and the expression levels of VEGF in multiple disease tissues in these patients. A total of 11 case-control studies, containing 302 OA patients and 195 healthy controls, demonstrate that VEGF expression levels in OA patients are significantly higher than healthy controls (standardized mean difference = 1.18, 95% CI: 4.91-9.11, $p < 0.001$), and these levels strongly correlate with the pathogenesis of osteoarthritis.⁷⁴

One of the mechanisms of cartilage degradation in OA is enzymatic proteolysis of the extracellular matrix by metalloproteinases. MMP-1, produced by chondrocytes and synovial cells, is a major protease of the MMPs family.

Barlas et al. evaluated three polymorphisms in the promoter of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2 and MMP-9 genes in patients with knee OA and compared with ethnically matched control. They found significant differences between the groups regarding the genotype distribution of MMP-1 polymorphism ($p = 0.001$). The frequencies of 1G/1G and 1G/2G genotypes were significantly higher in the knee OA than in the controls ($p = 0.002$, and $p = 0.006$, respectively). In addition, 1G allele frequency of MMP-1 gene was higher in the patients than in the control group ($p = 0.0001$). The genotype distributions and allele frequencies of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms did not differ between the OA and the control groups ($p > 0.05$). These findings suggest that the -1607 1G/2G polymorphism (rs1799750) in the MMP-1 gene may contribute to susceptibility to knee OA.⁷⁵

Similarly, Lepestos et al. evaluated the rs1799750 polymorphism in MMP-1 gene, but they did not find significant association in crude analysis; however, after multiple logistic regression analysis, 1G/2G was associated with reduced odds of knee OA by 75% in males, compared to genotypes 1G/1G + 2G/2G, adjusting for age and BMI (adjusted OR = 0.25, $p = 0.035$).⁷⁶

Finally, Honsawek et al. analyzed the MMP-3 (rs3025058, -1612) polymorphism with knee OA patients. The 5A allele frequency was indicated as 15.5%, and 6A allele was as 84.5% in OA patients, whereas it was 10-90% in the control group. Accordingly, the present study has indicated that the -1612 5A/6A polymorphism genotypes of MMP-3 gene promoter do not play a role in the development of OA.⁷⁷

These results suggest that the MMPs family activity is influenced by presence of genetic variants, which would break the balance between synthesis and degradation of extracellular matrix, and this condition may contribute to susceptibility of OA.

Nitric oxide (NO) is essential in the maintenance of vascular tonus and the presence of endothelial impairment (reduced vascular relaxation) may suggest a problem regarding the NO pathway. NO is produced by endothelial NO synthase (eNOS), and its production can be influenced by polymorphisms of the eNOS gene.⁷⁸ To date, no studies have been done related with OA and genetic polymorphisms of NOS; however, several genetic polymorphisms in the eNOS gene are associated with the pathogenesis of RA.

The level of NO is increased in RA patients, and a study suggested that NO can regulate the balance of Th1/Th2 in

autoimmune diseases, and it was a key mediator of apoptosis within rheumatoid arthritis joints. An et al. studied two polymorphisms of the eNOS gene (rs2070244, T-786C; and rs1799983, G894T) in patients with RA, and observed that individuals with the -786CC genotype have an increased risk of RA.⁷⁹

Brenol et al. evaluated the T-786C polymorphism in RA patients comparing with extraarticular manifestations. They found that the C allele was significantly associated (p corrected = 0.032), suggesting the participation of the T-786C polymorphism of the eNOS gene and RA.⁸⁰

These results we make suppose that eNOS gene polymorphisms can have an important impact on development of OA; it will be necessary to explore these genetic variants to corroborate it.

The erythropoietin-mediated bone marrow response to anemia is under the control of hypoxia-inducible factors (HIFs), the master regulators of oxygen and iron homeostasis. The hypoxic characteristics of joint cartilage make that HIF-1 α participates actively allowing transcription of target genes. Erythropoietin (EPO) gene is expressed after of an increase of HIF-1 α on cytoplasm.^{81,82} But to date, no scientific evidence that supports the possible association between erythropoietin and cartilage loss in OA; and even more, the presence of polymorphisms in EPO gene could represents an important factor associated with risk of OA.

Clinical relevance of PHDs inhibitors as potential therapeutic targets in OA

To date, HIF-1 inhibitors are classified by their HIF inhibitory mechanism, including affecting on HIF-1 α protein level, HIF-1 dimerization, HIF-1 DNA binding, or HIF-1 α transcription of target genes.⁸³ Due to the results described above, the main objective for achieving a therapeutic effect in the treatment of OA at cartilage level, could stabilize HIF-1 α in the cytoplasm so that it can induce the expression of restoration genes. Naturally, there are genetic polymorphisms that increase the transcriptional activity of HIF-1 α in comparison with common isoform. At the experimental level, has evaluated the Dimethylxallyl Glycine (DMOG), a potent inhibitor of prolyl-hydroxylases.⁸⁴ The endogenous HIF-1 α levels can be increased by the suppression of PHD activity, either by reducing the cellular oxygen level or by combining the Fe (II) competitively. DMOG is a cell permeable, competitive inhibitor of the PHDs. DMOG is an analog of 2-oxoglutarate, and in this way it inhibits not only the HIF prolyl but also asparaginyl hydroxylases. Beside that it is predicted to inhibit other members of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. There are three HIF-prolyl hydroxylases known in mammals, and they are encoded by separate genes: PHD1, PHD2, and PHD3. Like all 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, PHDs require oxygen for hydroxylation, as well as tricarboxylic acid cycle intermediate, 2-oxoglutarate (α -ketoglutarate), iron (Fe²⁺), and ascorbate as cofactors. When oxygen levels are low, HIF-1 α escapes PHD hydroxylation and recognition by the VHL.^{85,86}

Other inhibitors of PHDs with potential beneficial effects are deferoxamine (DFO) and cobalt chloride (CoCl_2), an iron chelator and a competitive inhibitor of iron, respectively; they are routinely used both *in vitro* and *in vivo* to inhibit PHDs activity by competing for endogenous iron (II). Other iron chelators, such as ciclopirox olamine, and competitive inhibitors of iron, such as Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} , are also used as PHDs inhibitors.⁵³

Likewise, there are studies showing that HIF-1 α and its target gene VEGF, are critical regulators of angiogenic-osteogenic coupling.^{7,87} In addition to chondrocytes, osteoblasts also express HIF-1 α and promote skeletal vascularization during endochondral bone formation; manipulation of the HIF system via pharmacological or genetic approaches, is an attractive strategy for treating hypoxic diseases, including skeletal diseases such as subchondral bone inflammation during OA.⁵³

Conclusion

Is worth mentioning that several associations' studies between SNPs and OA disease remain unconfirmed or controversial due to bias in patient enrolling criteria differences in OA affected joint sites, in classification and staging mode.

Cartilage destruction in OA mediated by catabolic enzymes and chondrocyte death, including apoptosis and/or autophagy, also contribute to the pathogenesis. The studies showed that the expression of HIF-1 is increased in OA cartilage to mediate the response of chondrocytes to hypoxia; HIF-1 acts as a survival factor by enhancing extracellular matrix synthesis and inhibiting apoptosis⁸⁸; HIF-1 serves to regulate both autophagy and apoptosis and HIF-1 is of pivotal importance in cartilage homeostasis.⁸⁹ Also, it will also be necessary to explore other isoforms of HIF, such as HIF-2 α , which it seems to have the opposite effect to HIF-1 α . The HIF-2 protein acts as a brake on the autophagy-accelerator function of HIF-1, and promotes chondrocyte hypertrophy, a terminal differentiation state characterized by a unique gene expression program, including type X collagen and the type II collagen-degrading protease MMP-13.⁹

Although further studies should elucidate the exact mechanism of HIF-1 in OA the current evidence induce to consider it as a promising approach to the treatment of OA. However, the results have been reported to indicate that genetic markers could contribute to the understanding of the natural history of this disease.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank Carlos Aguilar-González for his valuable support in the design of Figs. 3 and 4.

REFERENCES

- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2163–96.
- Fichera C, Pappalardo A, Triolo G, Gallo M, Valentini G, Bagnato G. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from OASIS study. *Reumatismo*. 2004;56:169–84.
- Komatsu M, Kamimura M, Nakamura Y, Mukaiyama K, Ikegami S, Uchiyama S, et al. Rapid bone destruction in a patient with knee osteoarthritis. A case report and review of the literature. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2014;11:232–5.
- Schipphof D, van Middelkoop M, de Klerk BM, Oei EH, Hofman A, Koes BW, et al. Crepitus is a first indication of patellofemoral osteoarthritis (and not of tibiofemoral osteoarthritis). *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;201:631–8.
- Musumeci G, Aiello FC, Szychlińska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6093–112.
- Meulenbelt I. Osteoarthritis year 2011 in review: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:218–22.
- Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1 alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001;15:2865–76.
- Pfander D, Cramer T, Swoboda B. HIF-1 alpha in osteoarthritis. *Int Orthop*. 2005;29(1):6–9.
- Coimbra IB, Jimenez SA, Hawkins DF, Piera-Velazquez S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(4):336–45.
- Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piera-Velazquez S, Crowl RM, Jiménez SA. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(2):404–19.
- Pfander D, Swoboda B, Cramer T. The role of HIF-1alpha in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:104. Epub 2006 Jan 18.
- Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk A, Candrian C, Lindberg R, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R34.
- Grimmer C, Pfander D, Swoboda B, Aingner T, Mueller L, Henning F, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 α is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4084–94.
- Distler K. Hypoxia and angiogenesis in rheumatic diseases. *Z Rheumatol*. 2003;62 Suppl2:II43–5.
- Wu L, Huang X, Li L, Huang H, Xu R, Luyten W. Insights on biology and pathology of HIF-1 α /-2 α , TGF β /BMP, Wnt/ β -catenin, and NF- κ B pathways in osteoarthritis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(22):3293–312.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group PRISMA. Preferred reporting items for systematic reviews and

- meta-analyses: the PRISMA statement. *PLOS Med*. 2009;6:e1000097.
17. Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25:815-23.
 18. Lee KM, Chung CY, Sung KH, Lee SY, Won SH, Kim TG, et al. Risk factors for osteoarthritis and contributing factors to current arthritic pain in South Korean older adults. *Yonsei Med J*. 2015;56:124-31.
 19. De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munaó F, Trimarchi G, et al. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from OASIS study. *Reumatism*. 2004;56:169-84.
 20. Fernández M, Rego F, Blanco F. Genetics in osteoarthritis. *Reumatol Clin*. 2007;3 Supl 3:S13-8.
 21. Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone*. 2012;51:258-64.
 22. Shi D, Zheng Q, Chen D, Zhu L, Qin A, Fan J, et al. Association of single-nucleotide polymorphism in HLA class II/III region with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:1454-7.
 23. Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res Appl*. 2014;10:264-96.
 24. Knez K, Spasic D, Janssen KP, Lammertyn J. Emerging technologies for hybridization based single nucleotide polymorphism detection. *Analyst*. 2014;139:353-70.
 25. Urano T, Narusawa K, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab*. 2007;25:253-8.
 26. Han Z, Liu Q, Sun C, Li Y. The interaction between obesity and RAGE polymorphisms on the risk of knee osteoarthritis in Chinese population. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30:898-904.
 27. Zhang R, Yao J, Xu P, Ji B, Voegeli G, Hou W, et al. Association between genetic variants of DVWA and osteoarthritis of the knee and hip: a comprehensive meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):9430-7.
 28. Qing Z, Ye J. Association between ACE polymorphisms and osteoarthritis susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):7391-6.
 29. Gu J, Rong J, Guan F, Jiang L, Tao S, Guan G, et al. MATN3 gene polymorphism is associated with osteoarthritis in Chinese han population: a community-based case-control study. *Scientific World J*. 2012;2012:656084.
 30. Meulenbelt I, Min J, Bos S, Riyazi N, Houwing J, Slagboom E, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1867-75.
 31. Poonpet T, Honsawek S, Tammachote N, Kanitnate S, Tammachote R. ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genet Mol Res*. 2013;12:5301-9.
 32. Wang L, Guo L, Tian F, Hao R, Yang T. Analysis of single nucleotide polymorphisms within ADAM12 and risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Biomed Res Int*. 2015;2015:518643.
 33. Kerna I, Kisand K, Tamm AE, Kumm J, Tamm AO. Two single-nucleotide polymorphisms in ADAM12 gene are associated with early and late radiographic knee osteoarthritis in Estonian population. *Arthritis*. 2013;2013:878126.
 34. Fernández-Torres J, Hernández-Díaz C, Espinosa-Morales R, Camacho-Galindo J, Galindo-Sevilla Ndel C, López-Macay A, et al. Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1 A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:218.
 35. Fernandes MT, Fernandes KB, Marquez AS, Cólus IM, Souza MF, Santos JP, et al. Association of interleukin-6 gene polymorphism (rs1800796) with severity and functional status of osteoarthritis in elderly individuals. *Cytokine*. 2015;75:316-20.
 36. Luo SX, Li S, Zhang XH, Zhang JJ, Long GH, Dong GF, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-16 and risk of knee osteoarthritis. *PLoS One*. 2015;10:e0123442.
 37. Liu Z, Ma L, Qiu S, Jia T. Genetic polymorphisms of interleukin-16 are associated with susceptibility to primary knee osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:1401-5, eCollection 2015.
 38. Pan F, Tian J, Winzenberg T, Ding C, Jones. Association between GDF5 rs143383 polymorphism and knee osteoarthritis: an updated meta-analysis based on 23,995 subjects. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:404.
 39. Tawonsawatruk T, Changthong T, Pingsuthiwong S, Trachoo O, Saura T, Wajanavisit W. A genetic association study between growth differentiation factor (GDF5) polymorphism and knee osteoarthritis in Thai population. *J Orthopaed Surg*. 2011;Res6:2-5.
 40. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1:461-8.
 41. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci*. 2014;15:8667-98.
 42. Chen JL, Duan L, Zhu W, Xiong J, Wang D. Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. *J Transl Med*. 2014;12:88.
 43. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12:127-34.
 44. Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C, Enomoto-Iwamoto M. Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013;99:192-202.
 45. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:284873.
 46. van der Kraan PM. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:1447-50.
 47. Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2015;82:144-7.
 48. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors—similar but not identical. *Mol Cells*. 2010;29:435-42.
 49. Görlach A. Regulation of HIF-1 alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des*. 2009;15:3844-52.
 50. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88:1474-80.
 51. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*. 2005;90:791-7.
 52. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277:38205-11.
 53. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *Biomed Res Int*. 2014;2014:239356.

54. Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 alpha protein stability and function. *Diabetes*. 2004;53:3226-32.
55. Zhou J, Hara K, Inoue M, Hamada S, Yasuda H, Moriyama H, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J Med Sci*. 2008;53:283-96.
56. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, et al. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis*. 2003;24:1779-83.
57. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, et al. Genetic variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5841-7.
58. Tzouveleki A, Ntoliou P, Karameris A, Koutsopoulos A, Boglou P, Koulelidis A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC Res Notes*. 2012;5:654.
59. Sartori-Cintra AR, Mara CS, Argolo DL, Coimbra IB. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics (São Paulo)*. 2012;67:35-40.
60. Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, et al. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene and lung cancer. *Exp Biol Med*. 2009;234:1109-16.
61. Li P, Cao Q, Shao PF, Cai HZ, Zhou H, Chen JW, et al. Genetic polymorphisms in HIF1A are associated with prostate cancer risk in a Chinese population. *Asian J Androl*. 2012;14:864-9.
62. Alidoosti M, Ghaedi M, Soleimani A, Bakhtiyari S, Rezvanfar M, Golkhu S, et al. Study on the role of environmental parameters and HIF-1A gene polymorphism in coronary collateral formation among patients with ischemic heart disease. *Clin Biochem*. 2010;44:1421-4.
63. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vasc Med*. 2010;15:371-4.
64. Nagy G, Kovacs R, Kereszturi E, Somogyi A, Szekely A, Nemeth N, et al. Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med Genet*. 2009;10:79.
65. Yang HY, Chuang SY, Fang WH, Huang GS, Wang CC, Huang YY, et al. Effect of RAGE polymorphisms on susceptibility to and severity of osteoarthritis in a Han Chinese population: a case-control study. *Genet Mol Res*. 2015;14:11362-70.
66. Swellam M, Mahmoud MS, Samy N, Gamal AA. Potential influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on knee osteoarthritis risk. *Dis Markers*. 2010;28:299-305.
67. Uchanska-Ziegler B, Loll B, Fabian H, Hee CS, Saenger W, Ziegler A. HLA class I-associated diseases with a suspected autoimmune etiology: HLA-B27 subtypes as a model system. *Eur J Cell Biol*. 2012;91:274-86.
68. Hong JM, Kim TH, Chae SC, Koo KH, Lee YJ, Park EK, et al. Association study of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) with osteonecrosis of femoral head in a Korean population. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:688-94.
69. Muz B, Larsen H, Madden L, Kiriakidis S, Paleolog EM. Prolyl hydroxylase domain enzyme 2 is the major player in regulating hypoxic responses in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2856-67.
70. Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Müller L, et al. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol*. 2006;169:491-502.
71. Raine EV, Dodd AW, Reynard LN, Loughlin J. Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility gene COL11A1 in human joint tissues. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14:85.
72. Rodríguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:940-9.
73. Sánchez-Enríquez S, Torres-Carrillo NM, Vázquez-Del Mercado M, Salgado-Goytia L, Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF. Increase levels of apo-A1 and apo B are associated in knee osteoarthritis: lack of association with VEGF-460T/C and +405C/G polymorphisms. *Rheumatol Int*. 2008;29:63-8.
74. Yuan Q, Sun L, Li JJ, An CH. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:437.
75. Barlas IO, Sezgin M, Erdal ME, Sahin G, Ankarali HC, Altintas ZM, et al. Association of (-1607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol Int*. 2009;29:383-8.
76. Lepetos P, Pampanos A, Kanavakis E, Tzetzis M, Korres D, Papavassiliou AG, et al. Association of MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) polymorphism with primary knee osteoarthritis in the Greek population. *J Orthop Res*. 2014;32:1155-60.
77. Honsawek S, Malila S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Deepaisarnsakul B, Parvizi J. Association of MMP-3 (-1612 5A/6A) polymorphism with knee osteoarthritis in Thai population. *Rheumatol Int*. 2013;33:435-9.
78. Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics*. 2007;8:1723-34.
79. An JD, Li XY, Yu JB, Zhao Y, Jin ZS. Association between the eNOS gene polymorphisms and rheumatoid arthritis risk in a northern Chinese population. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125:1496-9.
80. Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, Monticciolo OA, Franciscatto P, Birriel F, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol*. 2009;28:201-5.
81. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013;27:41-53.
82. Torti L, Teofili L, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Iachininoto MG, Massini G, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (Pro-582-Ser) polymorphism prevents iron deprivation in healthy blood donors. *Blood Transfus*. 2013;11:553-7.
83. Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012;49:24-40.
84. Yuan Q, Bleiziffer O, Boos AM, Sun J, Brandl A, Beier JP, et al. PHDs inhibitor DMOG promotes the vascularization process in the AV loop by HIF-1 α up-regulation and the preliminary discussion on its kinetics in rat. *BMC Biotechnol*. 2014;14:112.

-
85. Brocato J, Chervona Y, Costa M. Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 α and beyond. *Mol Pharmacol*. 2014;85:651-7.
 86. Smith TG, Talbot NP. Prolyl hydroxylases and therapeutics. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:431-3.
 87. Danis A. Mechanism of bone lengthening by the Ilizarov technique. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2001;156(1-2):107-12.
 88. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012;37:364-72.
 89. Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, Adams CS, Garcia JA, Shapiro IM, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1406-15.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00079

Matrícula: 2153804367

Interactoma de los polimorfismos de un solo nucleótido de la vía de señalización del Factor Inducible de Hipoxia- 1a en pacientes mexicanos con osteoartritis de rodilla.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de septiembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DR. GABRIELA ANGELICA MARTINEZ NAVA
DR. OSCAR HERNANDEZ HERNANDEZ
DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ



JAVIER FERNANDEZ TORRES
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JAVIER FERNANDEZ TORRES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DR. GABRIELA ANGELICA MARTINEZ NAVA

VOCAL

DR. OSCAR HERNANDEZ HERNANDEZ

VOCAL

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO

SECRETARIO

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ