

**FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE**



**ASOCIACION ENTRE VARIANTES ALÉLICAS DE LA FAMILIA DE GENES
RELACIONADOS CON LA ACCION DE FGF21 Y NIVELES PLASMÁTICOS DE
ADIPONECTINA EN EDAD PREPUBERAL**

Tesis presentada para optar al grado de Magister en Nutrición, otorgado por la Facultad de
Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Por:

EGHON ENRIQUE GUZMÁN MONTENEGRO

Director de Tesis:

JOSÉ LUIS SANTOS

DICIEMBRE 2018

RESUMEN

Introducción: El Factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21) y la adiponectina son dos importantes hormonas secretadas por el hígado y el tejido adiposo respectivamente. Estudios en animales de experimentación han propuesto que los efectos beneficiosos de FGF21 sobre la sensibilidad a la insulina están mediados por la adiponectina a través del eje FGF21-adiponectina. Mediante este eje, FGF21 promueve la síntesis y secreción de adiponectina. Variantes genéticas de FGF21 han sido asociadas previamente con variables cardiometabólicas y patrones de ingesta. **Objetivo:** Evaluar la asociación entre variantes alélicas de la familia de genes relacionados con la acción de FGF21 y los niveles plasmáticos de adiponectina en la edad prepuberal. **Sujetos y Método:** Estudio transversal de n=750 niños (Edad: 6.8 ± 0.44 años; 50,7% niñas), basado en la cohorte chilena de base poblacional “Estudio de Crecimiento y Obesidad” (ECO). A partir del microarreglo de genotipado masivo MEGA-Illumina, se determinaron los genotipos de 12 variantes de FGF21, 16 variantes del receptor FGFR1, 52 variantes de FGFR2, 3 variantes de FGFR3 y 17 variantes del co-receptor β -klotho (KLB). Las mediciones de adiponectina plasmática se realizaron mediante inmunoensayos. Las asociaciones entre variables se evaluaron mediante regresión lineal múltiple ajustando por edad, sexo, z-score de IMC y componentes principales indicadores de etnia. **Resultados:** Solamente una variante de KLB (rs80014142) y dos variantes de FGFR2 (rs3135808 y rs10510096) mostraron asociaciones nominalmente significativas con los niveles plasmáticos de adiponectina en niños de edad prepuberal (valores p de 0.006, 0.01 y 0.03 respectivamente). Ninguna de las tres variantes genéticas encontradas alcanzó significación tras corrección por comparaciones múltiples. Únicamente la variante rs80014142 se asoció significativamente con la razón leptina/adiponectina plasmática (p=0.003), que es considerado como un subrogado de resistencia a la insulina. Ninguna de estas variantes se asoció significativamente con el índice HOMA-IR. **Conclusión:** Es improbable que las variantes alélicas de la familia de genes relacionados con la acción de FGF21 tengan un impacto relevante en los niveles de adiponectina plasmática en edad prepuberal.

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21), es un polipéptido de 181 aminoácidos perteneciente a la familia de FGFs que se expresa intestino, tejido adiposo, páncreas e hígado, siendo este último el principal productor de FGF21 y el mayor contribuyente a los niveles circulantes de esta hormona (1,2). FGF21 se ha identificado como un regulador hormonal maestro del metabolismo de la glucosa, metabolismo lipídico y el balance energético global, actuando de forma endocrina, autocrina o paracrina en diferentes tejidos (3). La acción de FGF21 se ejerce a través de cuatro tipos de receptores de FGF denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4. La activación de estos receptores por FGF21 está condicionada a la co-expresión de β -Klotho (KLB), una proteína transmembrana descubierta por su similitud a Klotho (proteína que media la unión del receptor de FGF23) (4-9). Estudios con ratones transgénicos que sobre-expresan FGF21 han demostrado una protección contra la obesidad inducida por la dieta (10). Por el contrario, los ratones en los que FGF21 está suprimido muestran un aumento de peso y una tolerancia a la glucosa disminuida cuando se someten a una dieta alta en grasas (11). FGF21 fue descrita inicialmente como una hormona relacionada con la adaptación al ayuno, dado que sus niveles se incrementan a las pocas horas de la eliminación de la ingesta en ratones, presumiblemente orquestando una respuesta metabólica caracterizada por mayor gluconeogénesis hepática, una mayor estimulación de la síntesis de cuerpos cetónicos y una resistencia a la acción de la hormona de crecimiento. Sin embargo, en humanos se ha descrito que la elevación de los niveles circulantes de FGF21 no ocurre sino hasta al menos de 7 días de ayuno, sin que exista una aparente implicación de FGF21 en la estimulación de la producción de cuerpos cetónicos en el hígado (12). Por otra parte, se ha observado que la administración exógena de FGF21 en modelos de ratones obesos inducidos por dieta conduce a una mejora drástica y rápida de las anomalías metabólicas, incluyendo un incremento de la sensibilidad a la insulina, captación de glucosa independiente de insulina (parcialmente vía GLUT1), la corrección de los niveles altos de colesterol plasmático y la disminución del peso corporal (11-13). En humanos, la administración de un análogo de FGF21 (LY2405319) en pacientes adultos obesos con diabetes mellitus 2, generó una mejoría en el perfil lipídico (disminución de c-LDL y Triglicéridos plasmáticos), pérdida de peso y reducción significativa de los niveles de insulina en ayuno, replicando los efectos en animales. El mecanismo por el cual FGF21

mejoraría la glicemia estaría impulsado por la sensibilización a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo (12, 14).

Se ha propuesto que la acción de FGF21 en el tejido adiposo es determinante en los efectos de esta hormona sobre la homeostasis de la glucosa (14, 15). Uno de los mecanismos descritos para explicar los efectos sensibilizadores a la insulina de FGF21 implican la participación de la adiponectina en el llamado “eje FGF21-adiponectina” (16). Lin et al. (17) mostraron que la acción de FGF21 insulino-sensibilizadora en el tejido adiposo está atenuada en los ratones KO para adiponectina, lo que sugiere que esta adipoquina podría actuar como un mediador obligatorio de los beneficios vasculares y metabólicos provocados por FGF21. De forma relevante, se ha descrito que la transcripción y secreción de adiponectina están fuertemente inducidas por FGF21 mediante un mecanismo parcialmente dependiente de la actividad de receptor nuclear PPAR- δ (16-19). Consecuentemente, los ratones deficientes en FGF21 mostraron una adiponectina sérica significativamente más baja comparada con los ratones wild-type, tanto en condiciones de normopeso como en ratones con obesidad inducida por la dieta (16-19).

Estudios genómicos conducidos en cohortes epidemiológicas han mostrado que variantes genéticas de FGF21 se han asociado de forma significativa con factores de riesgo cardiometabólicos y patrones de ingesta relacionados con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina (20, 21). Dadas las relaciones existentes entre FGF21 (producida principalmente en el hígado) y la adiponectina (producida exclusivamente en el tejido adiposo) a través del eje FGF21-adiponectina que opera en adipocitos, nuestro objetivo fue evaluar la asociación entre variantes alélicas de la familia de genes relacionados con la acción de FGF21 y los niveles plasmáticos de adiponectina en una cohorte chilena de niños en edad prepuberal (ECO, Estudio de Crecimiento y Obesidad).

SUJETOS Y MÉTODOS

Diseño y Sujetos

Este es un estudio de corte transversal basado en los datos de la *cohorte pediátrica chilena de crecimiento y obesidad (ECO)*, con seguimiento desde el año 2006 desde el INTA (U. de Chile). Se constituyó con niños de edad entre 2,6 a 4 años, con peso al nacer de más de 2.500

gramos, asistentes a jardines infantiles del Programa Nacional Preescolar de Chile (JUNJI y JUNAEB) y provenientes del área sureste de 6 comunas de Santiago de Chile. Los criterios de inclusión y exclusión y la descripción de la cohorte pueden examinarse detalladamente en otras publicaciones (22).

Inicialmente se incluyeron 902 participantes de la cohorte ECO, a los cuales se les realizó un genotipado masivo y posterior análisis de calidad de datos junto a los criterios de exclusión, conservando 884 participantes. Luego, de estos participantes, se seleccionaron aquellos en etapa Tanner 1 de maduración sexual (Tanner, 1962) con posterior análisis de asociaciones genotípicas, obteniendo un tamaño muestral final de 750 participantes (Ver Figura 1). El presente estudio está asociado al Proyecto FONDECYT 1150416, con aprobación del Comité de Ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Genotipado Masivo de la cohorte ECO con el microarreglo MEGA-Illumina

Se realizó genotipado de más de 1.7 millones de variantes genéticas en 902 participantes de la cohorte ECO, utilizando el microarreglo de ADN llamado Multi-Ethnic Global BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) (MEGA-Illumina array). Para el análisis de calidad de datos genómicos, se utilizó el programa GenomeStudio v2.0.3 (Illumina) y PLINK v1.9. Los criterios de exclusión por control de calidad del genotipado, tanto de participantes o variantes genéticas, se basaron en una “call-rate” genotípico $< 0,99$, presencia de sexo discordante entre sexo registrado y resultados del microarreglo, relación de parentesco muy cercana ($IBD > 0.5$), tasa excesiva de heterocigosidad, valores extremos de de etnia discordante, desviación extrema del Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y frecuencia del alelo menor (MAF) bajo el 1%. Tras el análisis de calidad se conservaron 750 participantes. Con el total de variantes genéticas del microarreglo se derivaron componentes principales (PC) indicadores del componente étnico mediante el programa EIGENSTRAT.

Selección de variantes genéticas de la familia de genes de FGF21

Se seleccionaron las variantes genéticas en los genes de la ruta de acción de FGF21 (12 variantes de FGF21, 16 variantes de FGFR1, 52 variantes de FGFR2, 3 variantes de FGFR3 y 17 variantes de KLB). Estas variantes son Single Nucleotide Variants (SNVs) que

comprenden exones, intrones y regiones transcritas no traducidas (UTR, acrónimo de Untranslated Regions) del gen, así como todos los SNVs presentes en regiones situadas en la vecindad de FGF21 (± 10.000 pb río arriba y río-abajo del gen). La tabla 1 muestra las variantes del gen seleccionadas utilizando las coordenadas del ensamble del genoma humano versión GRCh37.

Se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) y bloques haplotípicos para cada gen seleccionado mediante el uso del programa HAPLOVIEW. En todos los genes evaluados, se constató un número variable de variantes genéticas que conforman bloques haplotípicos con importante asociación alélica (denominada en términos genéticos como “desequilibrio de ligamiento”). Como ejemplo, las 52 variantes genéticas de FGFR2 se agruparon en 8 bloques haplotípicos, mientras que las 12 variantes del gen FGF21 se agruparon en 2 bloques. (Figuras 4 y 5).

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre venosa fueron recogidas tras 8-12 horas de ayuno en los niños de la cohorte ECO. La determinación de adiponectina sérica se realizó mediante el método ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, INC., Asheville, NC, EE. UU.). La determinación de leptina sérica se realizó mediante un radioinmunoensayo (kit Millipore). Los niveles séricos de glucosa se midieron utilizando técnicas colorimétricas enzimáticas (HUMAN; Gesellschaft für Biochemical und Diagnostica, Wiesbaden, Alemania). La insulina sérica se determinó mediante el kit de radioinmunoensayo (Linco Research Inc., St Charles, MO). La evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se estimó como $\text{glucosa en ayunas (mmol / l)} \times \text{insulina en ayunas (mU / ml)} / 22.5$. Se calculó la razón de leptina y adiponectina plasmática como un índice subrogado de resistencia a la insulina.

Mediciones Antropométricas

En la cohorte ECO, el peso se midió mediante una balanza electrónica portátil (Seca 770, SECA, Hamburgo, Alemania), con una capacidad de 200 kg y una precisión de 10 g. La altura se midió con un estadiómetro portátil (Harpenden 603; Holtain Ltd, Crosswell, Reino Unido) con una escala de 1 a 200 cm y una precisión de 0,5 cm. El IMC se estimó como el peso en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados. Las puntuaciones z

estándar de peso para la edad (WAZ), altura para la edad (HAZ) e IMC para la edad (BAZ) se estimaron comparando estos valores con la referencia de la OMS 2006 y 2007. Se definió sobrepeso: ($1 \leq \text{BAZ} \leq 2$), obesidad ($\text{BAZ} > 2\text{SD}$) y obesidad central según la población hispana de NHANES 2004.

Análisis estadístico

Las estadísticas de resumen de variables bioquímicas y antropométricas se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se calcularon las frecuencias alélicas y se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y bloques haplotípicos para cada variante analizada, con el programa HAPLOVIEW.

Las asociaciones entre las variantes genéticas de la familia de genes de FGF21 y los niveles séricos de adiponectina se llevaron a cabo a través regresión lineal múltiple, utilizando un modelo genético aditivo ajustado por sexo, edad, BMI-z y 3 Componentes Principales genómicos asociados a etnias. Cuando las asociaciones eran significativas, se procedió a evaluar asociaciones con subrogados de sensibilidad a la insulina (HOMA-IR y razón leptina/adiponectina). Las variables dependientes utilizadas fueron LOG10 de Leptina, Adiponectina, razón Leptina/Adiponectina (LAR) y HOMA-IR.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software STATA 14.0. Se consideró un $p < 0.05$ como nominalmente significativo y se realizó corrección por comparaciones múltiples mediante el método de Bonferroni.

Cálculo de poder estadístico

Para nuestro estudio, hemos calculado que un tamaño muestral de $n=750$ provee de un poder estadístico mayor a 80%, con una $\alpha=0,05$ para detectar diferencias significativas en niveles plasmáticos de adiponectina (1 Desviación estándar) entre portadores versus no-portadores de variantes genéticas con una frecuencia alélica = 0,35.

RESULTADOS

La Tabla 2 indica las características de la muestra según sexo en las variables bioquímicas y antropométricas analizadas en el estudio. Entre todas las variantes genéticas estudiadas, solamente una variante de KLB (rs80014142) y dos variantes de FGFR2

(rs3135808 y rs10510096) mostraron asociaciones nominalmente significativas con los niveles plasmáticos de adiponectina en niños de edad prepuberal (valores p de 0.006, 0.01 y 0.03 respectivamente) (Ver Figura 2.A, 3 y 4). Ninguna de las tres variantes genéticas encontradas alcanzó significación tras corrección por comparaciones múltiples. La variante rs80014142 de KLB fue el único polimorfismo significativamente asociado adicionalmente a la razón leptina/adiponectina plasmática ($p=0.003$), que es considerado como un subrogado de resistencia a la insulina (Ver Figura 2.B). Adicionalmente, ninguna de las tres variantes mencionadas se asoció significativamente con el índice HOMA-IR.

DISCUSIÓN

Entre todas las variantes de la familia de genes relacionadas a la ruta de acción de FGF21 analizadas en participantes de la cohorte ECO, solo 3 de ellas se asociaron de manera nominalmente significativa a adiponectina plasmática, siendo 2 de éstas pertenecientes al gen del receptor FGFR2 y una variante del gen KLB. En nuestra investigación, la variante genética de KLB “rs80014142” se asoció de manera nominalmente significativa a adiponectina. Este resultado es sugerente de que el alelo alternativo implica un probable mayor riesgo de adiponectina disminuida, por ende, se podría traducir posiblemente en un mayor riesgo de presentar una resistencia a la insulina (Figura 2). Sin embargo, al realizar la corrección por comparaciones múltiples, no se alcanzó la significación estadística necesaria para establecer una asociación verdadera. Esta variante de KLB fue el único polimorfismo significativamente asociado a la razón leptina/adiponectina plasmática, que es considerado como un subrogado de resistencia a la insulina, afectando únicamente a los niveles de adiponectina plasmática. Esta asociación para el alelo menor de la variante, significaría que la presencia de éste posiblemente serviría como un marcador genético para detectar un probable factor de riesgo que pudiera establecer una mayor resistencia a insulina, por ende una menor sensibilidad de la misma, y posiblemente FGF21 como ligando estaría impedido de su unión al co-receptor beta-Klotho o de su transducción de señal intracelular, no ejerciendo su acción como regulador hormonal e insulinosensibilizador. En nuestro estudio también se realizó una regresión lineal con modelo genotípico para dos variantes de FGFR2, con logaritmo de adiponectina como variable dependiente, ajustado por edad, sexo, Z-Score de IMC y 3 Componentes Principales. Las variantes genéticas “rs3135808” y “rs10510096”

de FGFR2 mostraron una asociación nominalmente significativa a adiponectina, pero con baja magnitud de asociación. Observamos que el portador del alelo menor en la variante genética “rs3135808” muestra un mayor nivel de adiponectina plasmática y el portador del alelo mayor en la variante genética “rs10510096” también muestra un mayor nivel de adiponectina plasmática, siendo este resultado sugerente de que estas variantes podrían ser marcadores para la variante causal asociada a los niveles plasmáticos de adiponectina, sin embargo al corregir por comparaciones múltiples tampoco se alcanzó significación estadística.

La adiponectina es una hormona producida por el tejido adiposo que circula en el plasma en concentraciones aproximadamente tres veces más altas que la mayoría de las otras hormonas, lo que representa hasta el 0,01% del total de proteínas plasmáticas (23). En contraste con la mayoría de las otras adipoquinas (por ejemplo, la leptina), la adiponectina ejerce sus efectos beneficiosos a través de poderosas acciones de sensibilización a la insulina, así como a través de los efectos antiinflamatorios y anti-aterogénicos, que ejerce a través de sus receptores AdipoR1 y AdipoR2 expresados principalmente en el hígado y el músculo. La adiponectina también aumenta la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético, promueve la utilización de la glucosa y reduce la producción de glucosa hepática. Se ha propuesto que los efectos sensibilizadores de FGF21 podrían estar mediados por sus efectos sobre la síntesis y secreción de adiponectina en el tejido adiposo, implicando que las variantes genéticas de los genes de la familia de FGF21 podrían estar implicadas en los niveles de adiponectina circulante. Sin embargo, no hemos encontrado en nuestro estudio dicha relación. En este sentido, vale la pena mencionar que un estudio de ayuno prolongado en humanos encontró que niveles de adiponectina reducidos durante un ayuno prolongado días, no se modificaron de forma notoria al incrementarse los niveles de FGF21 tras 7-10 días de ayuno, lo que fue interpretado por los autores como una ausencia del efecto del eje- FGF21-adiponectina al menos en el contexto fisiológico del ayuno prolongado.

El genotipado masivo realizado a los participantes de la cohorte ECO, utilizando el microarreglo de ADN, con un análisis de más de 1.700.000 variantes genéticas de interés y posterior evaluación de calidad de datos con el programa GenomeStudio, permitió obtener variantes genéticas con una frecuencia alélica y un grado de desequilibrio de ligamiento en la familia de genes de FGF21 que cumplieran con los criterios de inclusión para este estudio.

La epidemiología genética ha progresado significativamente en los últimos años y la disponibilidad de plataformas de genotipado que pueden analizar cientos de miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), ha hecho posible realizar exploraciones de alta resolución en todo el genoma humano (GWAS) o en varios genes candidatos, identificando así las variantes genéticas asociadas con fenotipos de interés. La principal ventaja de estos estudios es que no requieren suposiciones a priori sobre un posible papel de los alelos, genes y vías en la regulación del rasgo examinado. Sin embargo, debido a la escala de dicho análisis, surge el problema de la corrección sustancial de múltiples pruebas y, por lo tanto, se necesitan cohortes y replicaciones representativas para reducir la probabilidad de falsos positivos. Por lo tanto, los estudios de genotipado son una herramienta de elección para el análisis de asociación de variantes genéticas con potencial influencia en el fenotipo de interés. Para este tipo de investigación, la exploración sistemática de numerosas o de todas las variantes alélicas comunes en genes que codifican moléculas dentro de la ruta seleccionada es el método de elección. Dentro de nuestra investigación evaluamos el desequilibrio de ligamiento de las variantes genéticas de la familia de genes candidatos relacionados a FGF21, obteniendo bloques haplotípicos para cada gen evaluado. Las variantes estudiadas señalan una posición dentro de un bloque haplotípico y servirían como marcador de la variante causal (no necesariamente de la estudiada) para un fenotipo específico, en este caso sensibilidad a la insulina. Como ejemplo se exponen las variantes genéticas medidas de FGFR2, consolidadas en 8 bloques haplotípicos y que muestran cierto grado de asociación alélica, lo cual significa que los genotipos pueden ser predichos por la información de los SNPs circundantes y es útil para evaluar asociación de rasgos biomédicos.

Estudios genómicos conducidos en cohortes epidemiológicas han mostrado que variantes genéticas de FGF21 se han asociado de forma significativa con factores de riesgo cardiometabólicos y patrones de ingesta relacionados con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina (20, 21). En el año 2010, se analizaron 63 SNPs en cinco genes de la ruta de acción de FGF21 (FGF21, KLB, FGFR1, FGFR2, FGFR3) y cuatro fenotipos metabólicos (colesterol LDL - LDL-C, HDL-colesterol - HDL-C, triglicéridos e índice de masa corporal) en 629 individuos del Estudio de Hipertensión de Silesia (SHS), con replicación en 2 cohortes distintas (21). De los 54 SNPs que cumplieron con los criterios de control de calidad después de la genotipificación en SHS, 4 variantes genéticas mostraron

asociación sugestiva con LDL-C y 1 variante en KLB se asoció de manera significativa con índice de masa corporal. El efecto alélico de las variantes estudiadas fue consistente con el aumento de LDL-C en las cohortes evaluadas y estos datos muestran que las variaciones genéticas comunes en FGFR2 pueden estar asociadas con los niveles de LDL-C en sujetos de ascendencia blanca europea. No encontramos estudios de asociación de SNPs de los genes involucrados en la ruta de acción de FGF21 con subrogados de insulina y con niveles plasmáticos de adiponectina en edad prepuberal, presentes en la literatura científica publicada.

En conclusión, es improbable que las variantes alélicas de la familia de genes relacionados con la acción de FGF21 tengan un impacto relevante en los niveles de adiponectina plasmática en edad prepuberal. Esto es debido a que ninguna de las variantes genéticas encontradas alcanzó significación estadística tras corrección por comparaciones múltiples.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por FONDECYT 1150416.

REFERENCIAS

1. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 24: 2050–2064, 2010. doi:10.1210/me.2010-0142.
2. Xuang Ge et al., Review “Metabolic actions of FGF21: molecular mechanisms and therapeutic implications”, *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012;2(4):350–357.
3. Xie T, Leung PS. Fibroblast growth factor 21: a regulator of metabolic disease and health span. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 313: E292–E302, 2017.
4. Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A et al: FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Moore DD: Physiology. Sister act. Science* 2007; 316: 1436–1438.
5. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G et al: Endocrine regulation of the fasting response of FGF21. *J Clin Invest* 2005; 115: 1627–1635.
6. Inagaki et al. PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007; 5: 415–425.
7. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M et al: BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7432–7437.
8. Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K et al: BetaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1006–1014.
9. Kharitononkov A, Dunbar JD, Bina HA et al: FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol* 2008; 215: 1–7.
10. Kharitononkov A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1627–1635.
11. Badman MK, Koester A, Flier JS, Kharitononkov A, Maratos-Flier E. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology.* 2009;150(11):4931–4940.

12. Fazeli PK, Lun M, Kim SM, Bredella MA, Wright S, Zhang Y, Lee H, Catana C, Klibanski A, Patwari P, Steinhauser ML. FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *J Clin Invest* 2015 Nov 3;125(12):4601-11.
13. Gaich, G., et al., 2013. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with Type 2 diabetes. *Cell Metabolism* 18 (3):333–340.
14. Adams AC, et al. The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol Metab.* 2013;2(1):31–37.
15. Ding X, et al. β Klotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab.* 2012;16(3):387–393.
16. Hui X, Feng T, Liu Q, Gao Y, Xu A. The FGF21-adiponectin axis in controlling energy and vascular homeostasis. *J Mol Cell Biol.* 2016 Apr;8(2):110-9.
17. Lin, Z. Et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab.* 17, 779—789 (2013).
18. Holland, W. Et al. An FGF21-Adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab.*17, 790—797 (2013).
19. Goetz, R. (2013). Adiponectin—a mediator of specific metabolic actions of FGF21, 9(9), 506-508.
20. Frayling TM, Beaumont RN, Jones SE, Yaghootkar H, Tuke MA, Ruth KS, Casanova F, West B, Locke J, Sharp S, Ji Y, Thompson W, Harrison J, Etheridge AS, Gallins PJ, Jima D, Wright F, Zhou Y, Innocenti F, Lindgren CM, Grarup N, Murray A, Freathy RM, Weedon MN, Tyrrell J, Wood AR. A Common Allele in FGF21 Associated with Sugar Intake Is Associated with Body Shape, Lower Total Body-Fat Percentage, and Higher Blood Pressure. *Cell Rep.* 2018 Apr 10;23(2):327-336.
21. Bernhard M Kaess et al., FGF21 signalling pathway and metabolic traits – genetic association analysis. *European Journal of Human Genetics* (2010) 18, 1344–1348.
22. Sánchez U, Weisstaub G, Santos JL, Corvalán C, Uauy R (2016) GOCS cohort: child eating behavior scores and BMI. *European Journal Of Clinical Nutrition* 70: 925. doi: 10.1038/ejcn.2016.18.
23. Elissondo N, Rosso LG, Maidana P, Brites F. Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 2008;42(1):17-33.

Gen	Cromosoma	Alelos	ID/Variante	Tipo	MAF	P-value/HWE	
FGFR3	4	G/C	rs114803756	Upstream	0,02	1	
	4	G/A	rs3135877	Intron	0,08	0,534	
	4	A/G	rs4865477	3' UTR	0,01	1	
KLB	4	G/T	rs13135439	Upstream	0,42	0,475	
	4	C/A	rs900563	Intron	0,35	0,852	
	4	G/A	rs11940694	Intron	0,49	1	
	4	T/C	rs13147477	Intron	0,31	0,142	
	4	T/G	rs7674434	Intron	0,19	0,603	
	4	T/C	rs76850498	Intron	0,03	0,026	
	4	T/A	rs4975013	Intron	0,45	0,524	
	4	C/T	rs17431867	Intron	0,10	0,233	
	4	T/C	rs1979283	Intron	0,22	0,689	
	4	C/T	rs3102165	Intron	0,04	0,454	
	4	G/A	rs78866102	Intron	0,04	0,609	
	4	A/G	rs2687963	Intron	0,25	1	
	4	A/G	rs2249177	3' UTR	0,39	0,456	
	4	C/T	rs9995998	3' UTR	0,16	0,865	
	4	G/A	rs2249563	Downstream	0,22	0,689	
	4	G/A	rs80014142	Downstream	0,03	0,828	
	4	A/C	rs76719739	Intron	0,05	0,256	
	FGFR1	8	A/G	rs77712782	Intron	0,04	0,819
		8	G/A	rs3925	Intron	0,24	0,625
		8	C/G	rs2304000	Intron	0,24	0,557
		8	A/C	rs10101096	Intron	0,27	0,833
		8	G/A	rs6983315	Intron	0,37	0,145
		8	C/T	rs6474354	Intron	0,14	0,426
		8	C/T	rs78403306	Intron	0,07	0,931
		8	T/C	rs17580578	Intron	0,06	0,950
		8	A/G	rs17182141	Intron	0,03	0,828
		8	T/C	rs7388222	Intron	0,31	0,465
8		T/C	rs13254512	Intron	0,23	0,697	
8		G/A	rs6996321	Intron	0,35	0,165	
8		G/A	rs17175631	Intron	0,07	0,311	
8		A/G	rs7825208	Intron	0,11	0,109	
8		C/T	rs2604494	Intron	0,01	1	
8		T/C	rs881301	Intron	0,24	0,878	
FGF21		19	C/A	rs56151905	Downstream	0,15	0,866
		19	G/A	rs838143	Downstream	0,15	0,866
	19	C/T	rs12611028	Downstream	0,25	0,590	
	19	A/G	rs4021	Downstream	0,41	0,934	
	19	C/T	rs4015	Downstream	0,26	0,906	
	19	G/C	rs41308762	Downstream	0,01	1	
	19	G/A	rs838133	Intron	0,24	0,304	
	19	C/T	rs490942	Intron	0,12	1	
	19	A/G	rs2548957	Upstream	0,35	0,927	
	19	G/A	rs78627671	Upstream	0,14	1	
	19	T/C	rs79390987	Upstream	0,04	0,666	
	19	C/T	rs73585730	Upstream	0,17	0,746	

Gen	Cromosoma	Alelos	ID/Variante	Tipo	MAF	P-value/HWE
FGFR2	10	C/T	rs7072877		0,31	0,575
	10	T/C	rs71484671	Intergénica	0,04	1
	10	C/T	rs34143724	Intergénica	0,15	0,438
	10	A/G	rs1649204	Downstream	0,15	0,511
	10	A/G	rs1649200	Intron	0,10	0,531
	10	G/A	rs3135808	Intron	0,01	1
	10	T/C	rs2981461	Intron	0,29	1
	10	A/G	rs2912795	Intron	0,30	0,956
	10	G/A	rs3135782	Intron	0,09	0,728
	10	A/G	rs2912755	Intron	0,12	0,546
	10	C/T	rs61876366	Intron	0,03	1
	10	T/G	rs7090018	Intron	0,41	0,946
	10	C/A	rs3135763	Intron	0,17	0,534
	10	T/C	rs2420942	Intron	0,01	1
	10	C/T	rs3135758	Intron	0,04	0,716
	10	G/T	rs2981451	Intron	0,44	0,326
	10	T/C	rs2981448	Intron	0,01	1
	10	C/T	rs2071616	Intron	0,25	0,320
	10	A/G	rs370631655	Intron	0,10	0,316
	10	C/A	rs12356416	Intron	0,47	0,775
	10	A/G	rs140794722	Intron	0,01	1
	10	C/T	rs74348513	Intron	0,09	0,643
	10	G/C	rs11199993	Intron	0,07	1
	10	T/G	rs2912770	Intron	0,24	0,305
	10	T/C	rs17102176	Intron	0,09	0,562
	10	A/G	rs755793	Missense	0,10	0,586
	10	A/C	rs3135736	Intron	0,10	0,818
	10	C/T	rs17542209	Intron	0,11	1
	10	G/A	rs2912791	Intron	0,33	0,343
	10	G/C	rs2981452	Intron	0,09	0,497
	10	G/A	rs2981432	Intron	0,39	0,410
	10	G/C	rs1863741	Intron	0,48	0,904
	10	G/C	rs10510096	Intron	0,11	0,147
	10	T/C	rs10510098	Intron	0,10	0,856
	10	G/A	rs4752567	Intron	0,04	0,561
10	T/A	rs17614575	Intron	0,01	1	
10	C/T	rs3750817	Intron	0,39	0,359	
10	G/A	rs45631611	Intron	0,04	1	
10	G/A	rs2981579	Intron	0,44	0,025	
10	A/G	rs17542768	Intron	0,24	0,260	
10	A/G	rs1078806	Intron	0,43	0,015	
10	T/C	rs2981578	Intron	0,48	0,057	
10	A/G	rs45631582	Intron	0,04	1	
10	G/A	rs1219651	Intron	0,44	0,031	
10	A/G	rs45631583	Intron	0,10	0,787	
10	A/G	rs2981575	Intron	0,44	0,033	
10	A/G	rs1219648	Intron	0,44	0,031	
10	C/A	rs1219643	Intron	0,13	0,998	
10	G/A	rs2981582	Intron	0,43	0,078	
10	T/G	rs3135715	Intron	0,30	0,003	
10	C/T	rs12268516	Intron	0,06	0,371	
10	A/G	rs77669026	Intergénica	0,21	0,032	

Tabla 1. Genes y Variantes Genéticas de la Familia de FGF21 provenientes del microarreglo MEGA-Illumina. **Abreviaciones:** ID Variante = Identificación, MAF = Frecuencia Alélica Mínima, P-value HWE = Valor P de Equilibrio de Hardy-Weinberg, KLB = Beta-Klotho.

Variables	Niños (n=370)	Niñas (n=380)	Valor P
	Promedio ± Desv Std	Promedio ± Desv Std	
Edad (años)	6.83 ± 0.45	6.76 ± 0.42	0.02
Puntaje z de IMC	0.92 ± 1.28	0.75 ± 1.01	0.04
IMC	17.2 ± 2.40	17.0 ± 2.14	0.22
Leptina plasmática (ng/ml)	5.82 ± 4.02	5.78 ± 4.02	0.96
Adiponectina plasmática (mg/l)	18.41 ± 7.26	17.44 ± 6.20	0.05
Razón Leptina/Adiponectina	0.38 ± 0.39	0.38 ± 0.33	0.99
Glicemia (mg/dl)	90.54 ± 6.71	88.91 ± 6.36	< 0.001
Insulinemia (μU/dl)	5.49 ± 2.11	5.49 ± 1.35	0.98
HOMA-IR	1.24 ± 0.67	1.21 ± 0.34	0.41

Tabla 2. Mediciones bioquímicas y antropométricas de los sujetos de estudio.

Variantes	Variable Asociada	Genotipo	Coefficiente Beta	Error Estándar	Valor P	IC 95%	
rs80014142 (KLB)	Log-Adiponectina	Modelo Aditivo	-0,074	0,027	0,006	-0,127	-0,021
rs3135808 (FGFR2)	Log-Adiponectina	Modelo Aditivo	0,088	0,034	0,011	0,021	0,155
rs10510096 (FGFR2)	Log-Adiponectina	Modelo Aditivo	-0,029	0,013	0,031	-0,055	-0,003

Tabla 3. Asociación entre variantes genéticas de KLB y FGFR2 y niveles de adiponectina plasmática en niños en edad prepuberal. Los análisis fueron ajustados por ajustado por sexo, edad, Puntaje z de IMC y 3 Componentes Principales derivados de los datos genómicos (PC1-PC3).

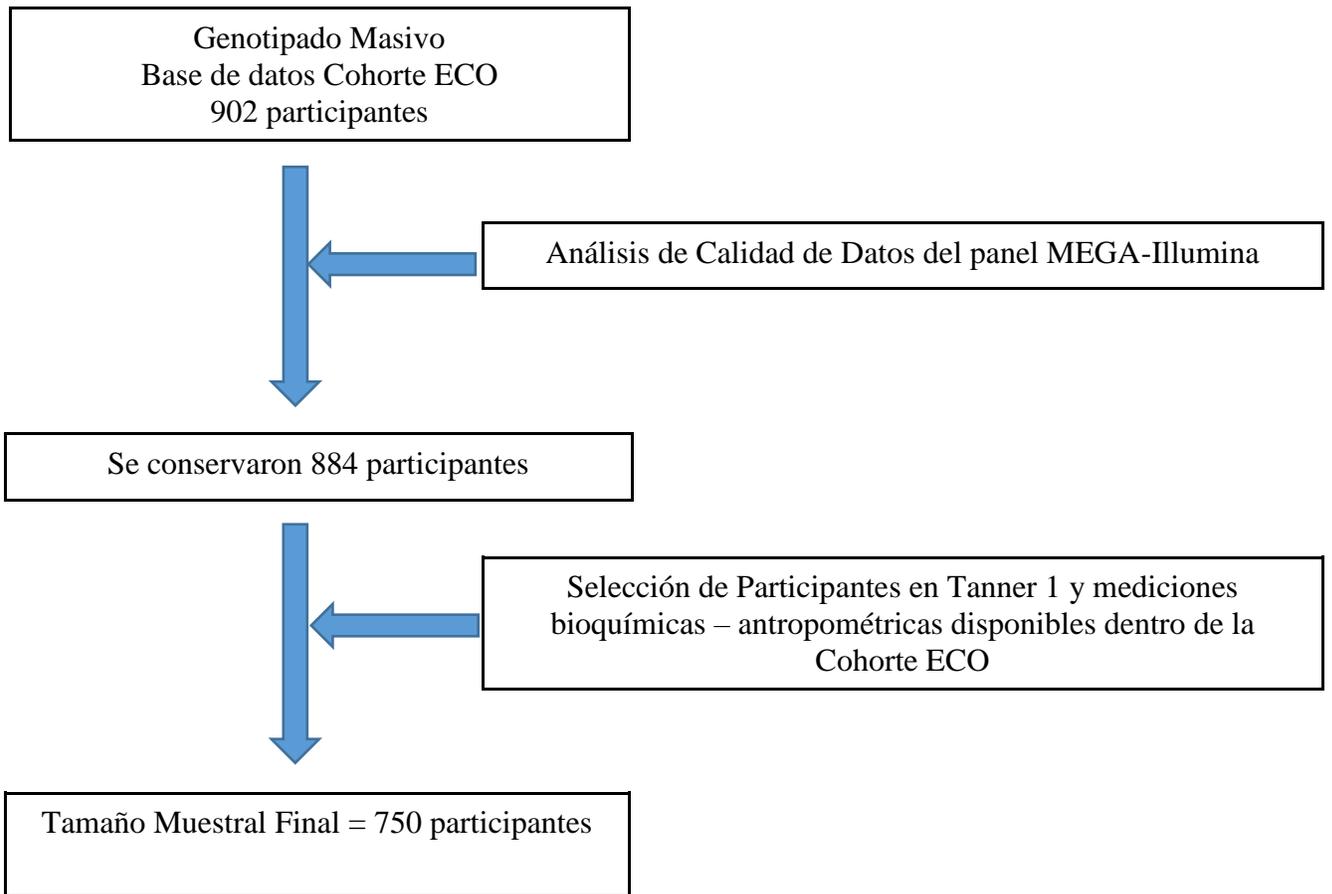


Figura 1. Flujograma de selección de la muestra.

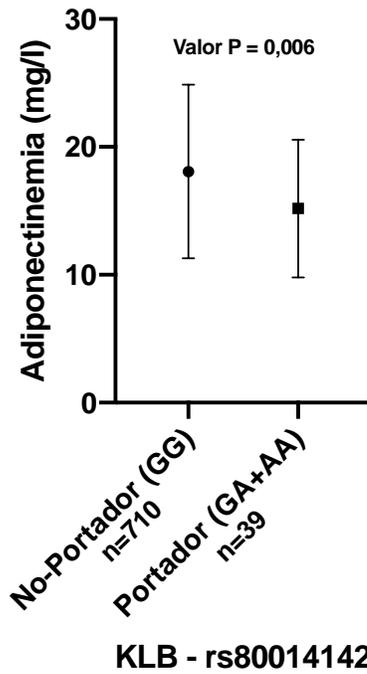
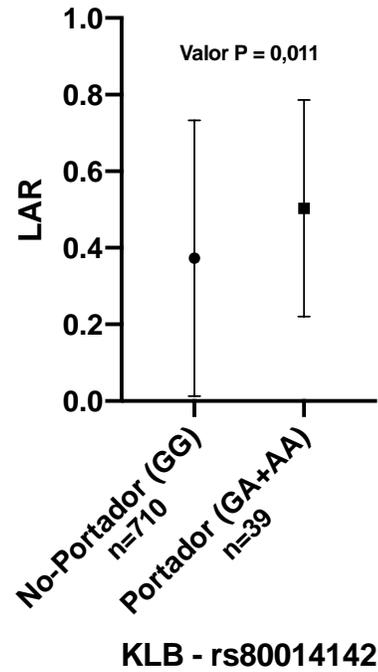
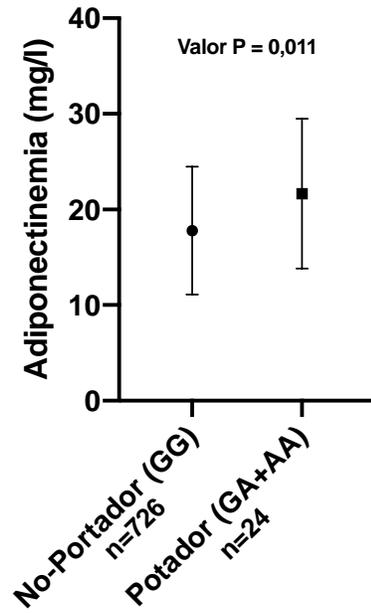
A**B**

Figura 2.A.- Valores de Adiponectina (Promedio \pm Desviación Estándar) según genotipo de la variantes indicadas del gen KLB. **2.B.-** Valores de LAR (Promedio \pm Desviación Estándar) según genotipo de las variantes indicadas del gen KLB. Los análisis fueron ajustados por sexo, edad, Puntaje z de IMC y 3 Componentes Principales derivados de los datos genómicos (PC1-PC3).



FGFR2 - rs3135808

Figura 3. Valores de Adiponectina (Promedio \pm Desviación Estándar) según genotipo de la variante indicada del gen FGFR2. Los análisis fueron ajustados por sexo, edad, Puntaje z de IMC y 3 Componentes Principales derivados de los datos genómicos (PC1-PC3).

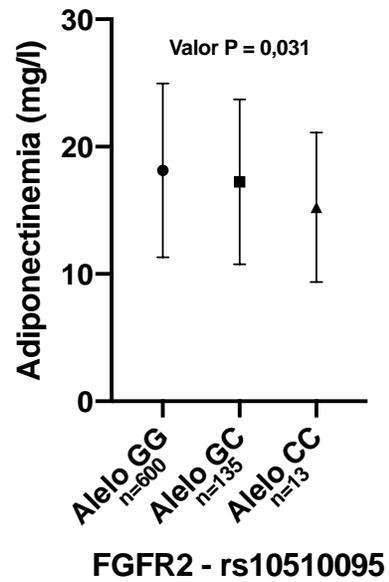


Figura 4. Valores de Adiponectina (Promedio \pm Desviación Estándar) según genotipo de la variante indicada del gen FGFR2. Los análisis fueron ajustados por sexo, edad, Puntaje z de IMC y 3 Componentes Principales derivados de los datos genómicos (PC1-PC3).

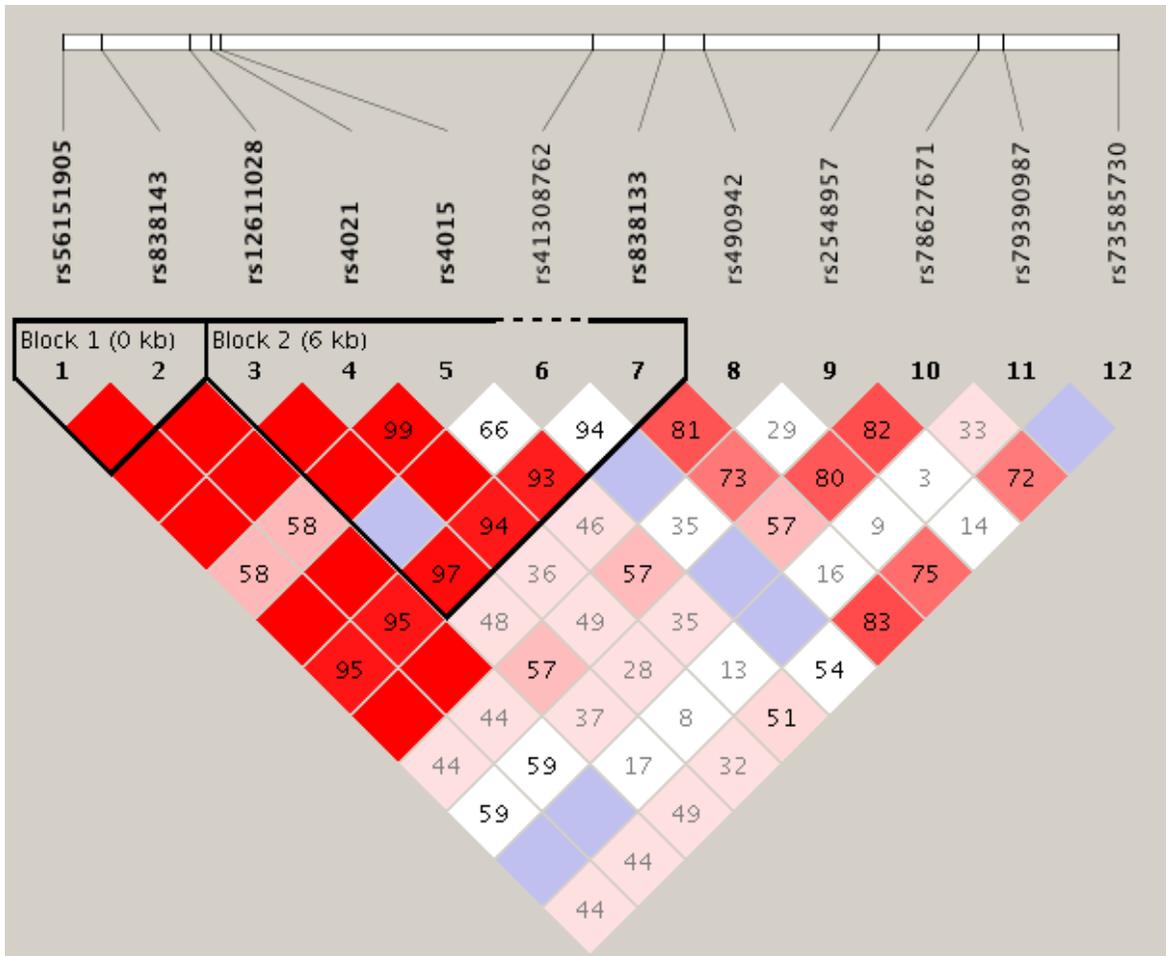


Figura 5. Desequilibrio de Ligamiento y Bloques Haplotípicos de las 12 Variantes del gen FGF21

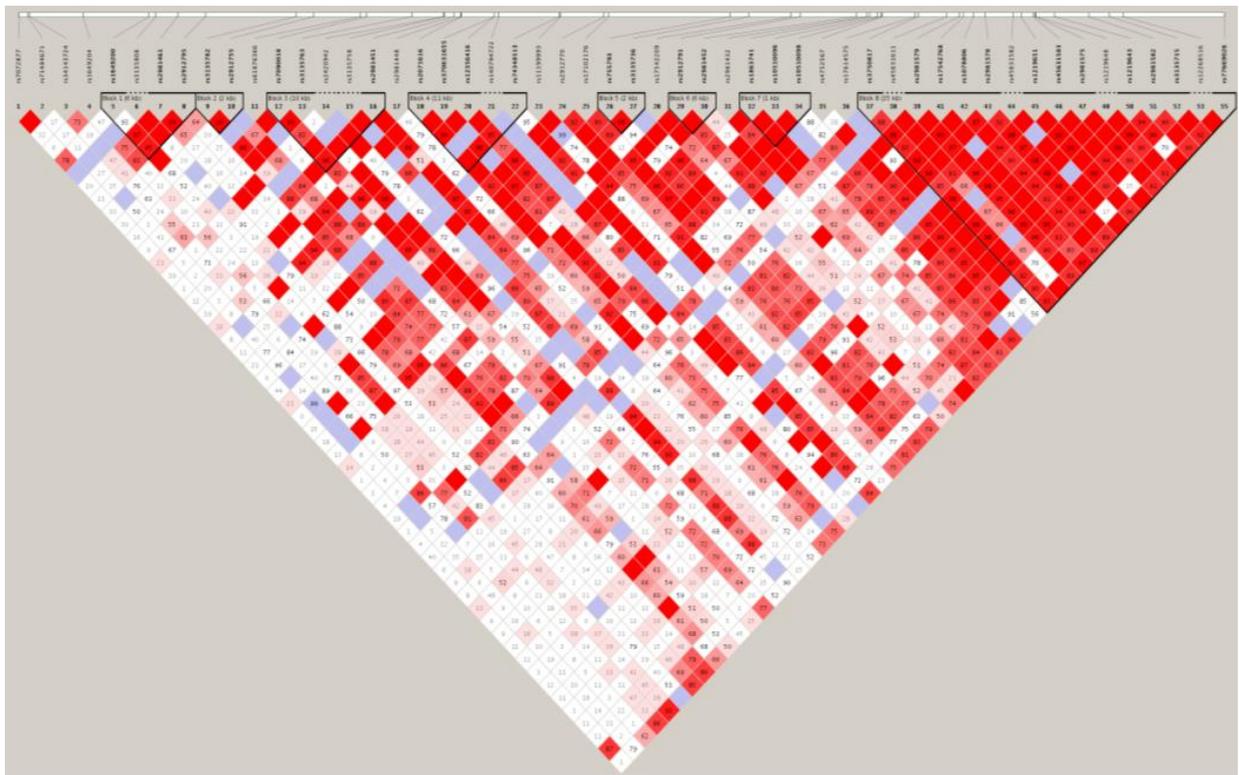


Figura 6. Desequilibrio de Ligamiento y Bloques Haplóticos de las 52 Variantes del gen FGFR2.