



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

**Q.F.B.**

ORIENTACIÓN: BIOQUÍMICA CLÍNICA



UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**TESIS PARA OBTENER TÍTULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICO  
BIOLÓGICA**

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE  
ESTRÓGENOS COMO MARCADORES DE RIESGO GENETICO  
PARA LA PRESENTACIÓN DE FRACTURAS  
OSTEOPORÓTICAS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS DE  
ORIGEN ÉTNICO MESTIZO-MEXICANO

Presenta: Alma Beatriz Pérez Sevilla

Directora de tesis: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Adscripción: División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

Asesora de tesis: Dra. Raquel Retana Ugalde



México, DF. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

- *A Dios por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.*
- *A mis padres Emilia Sevilla y Gerardo Pérez por su confianza, por su apoyo incondicional y por la educación que me han brindado, ya que ello ha forjado una mujer de provecho.*
- *A mis hermanas Marisol, Lidia y Brenda esperando que les sirva como ejemplo para seguir adelante con sus proyectos de vida.*
- *A mi directora de Tesis Dra. Ileana Patricia Canto Cetina: por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte del grupo de trabajo; por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.*
- *A la Dra. Raquel Retana Ugalde: por ser una gran profesora, que me motivo para enfocarme a genética; asimismo por sus consejos recibidos en la redacción de la tesis.*
- *Al Dr. David Rojano: por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas y por sus sugerencias en la redacción de la tesis.*
- *Al TL. Agustín Coronel por su fundamental ayuda y asesoramiento en el trabajo del laboratorio.*
- *A todos los Doctores y estudiantes del laboratorio de Biología el Desarrollo del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, que me han apoyado y acompañado en este trabajo.*

*La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología el Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).*

*Este trabajo se llevo a cabo por el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), apoyo 2009-113574.*

# ÍNDICE

	Página
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Fundamentación teórica.....	8
Epidemiología.....	8
Clasificación.....	9
Fisiopatología.....	9
Menopausia.....	12
Fracturas secundarias a osteoporosis.....	13
Factores de riesgo.....	15
Factores genéticos.....	15
Polimorfismo en el gen del <i>Receptor de Estrógenos <math>\alpha</math></i> ( <i>ESR1</i> o <i>ESR- <math>\alpha</math></i> ).....	16
Planteamiento del problema.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
Diseño de investigación.....	19
Criterios de inclusión y exclusión.....	20

Variables.....	20
Metodología para el diagnóstico de osteoporosis.....	21
Metodología experimental.....	23
Extracción de ADN de sangre periférica.....	23
Determinación de la concentración del ADN.....	25
Determinación de la calidad del ADN.....	27
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real.....	28
Diagrama de flujo.....	30
Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	33
Discusión de resultados.....	39
Conclusiones.....	44
Referencias.....	45
Anexo (1).....	51
Anexo (2).....	53

## RESUMEN

En las mujeres posmenopáusicas la deficiencia de estrógenos es una de las causas principales para el desarrollo de osteoporosis. Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la deficiencia del gen *ESR1* se traduce en una disminución en la DMO (Densidad Mineral Ósea), así como a una pérdida ósea acelerada con el consiguiente desarrollo de osteoporosis e incremento en el riesgo de presentar fracturas.

El objetivo de esta tesis fue determinar si los genotipos de las regiones polimórficas rs9340799 (corte *Xba1*) y rs2234693 (corte *PvuII*) en el gen *ESR1* se encuentran asociados con la presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano. Para ello se estudiaron 202 mujeres posmenopáusicas, de ellas 101 representaban los casos, los cuales previamente se les diagnosticó osteoporosis, asimismo se confirmó la existencia de fractura por fragilidad y se determinó en que zona presentaba la fractura. Posteriormente se estudió el ADN obtenido de sangre periférica, analizando las regiones polimórficas (*PvuII* y *XbaI*) mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real.

Los resultados obtenidos indican que hay una asociación significativa para el modelo recesivo de la región polimórfica rs9340799 (corte *XbaI*) y la presencia de fracturas por fragilidad. Asimismo, el genotipo G/G de la región polimórfica *XbaI* (rs9340799) está relacionado con un aumento en la densidad mineral ósea, pero no se relaciona con la protección de fracturas por fragilidad. También en el análisis de haplotipos de las regiones polimórficas del intrón 1 de *ESR1* (*PvuII* y *XbaI*) se correlacionó mejor con la presencia y protección a fracturas por fragilidad, de manera que las mujeres con haplotipo A-C presentaron una mayor asociación de fracturas y las que presentaron el haplotipo G-C parecen estar protegidas.

## INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es uno de los principales problemas de Salud Pública Mundial, ya que alrededor de un tercio de las mujeres menopáusicas y posmenopáusicas presentan dicha patología y un tercio de las mismas desarrollan fracturas. Las fracturas por fragilidad son una de las principales causas de incapacidad y el costo por hospitalización es altísimo, sólo en los Estados Unidos de Norteamérica, el costo por hospitalización de esas mujeres fue de alrededor de USD 13.8 billones/anual y en el Reino Unido de alrededor de 1.7 billones de libras/año. En México, alrededor de 3.5 millones de personas mayores de 60 años de edad, requieren de prevención o tratamiento de osteoporosis, 6.7 millones de personas entre los 35 y 60 años, presentan algún grado de osteopenia y se estima que 15 millones de individuos menores de 35 años cuando cumplan alrededor de 60 años, presentarán alguna disminución de la masa ósea pico. Con base en lo anterior, se estima que alrededor de 24.5 millones de personas que habitan en la República Mexicana, podrían requerir de alguna intervención terapéutica, y de éstas, alrededor de 18 millones habitan en la Ciudad de México. Lo anterior implica un problema de salud prioritario, que demanda la puesta en marcha de programas de diagnóstico, prevención y tratamiento oportuno.

Actualmente a nivel mundial, se están llevando a cabo numerosos esfuerzos para identificar a los subtipos de mujeres que presentan un alto riesgo de desarrollar fracturas por fragilidad, con la finalidad de desarrollar pruebas de tamizajes y futuras estrategias profilácticas dirigidas a aquellas mujeres que presentan el riesgo más alto, de pérdida ósea después del cese de la menstruación. Sin embargo, estos esfuerzos no darán los mejores resultados, hasta que entendamos que en la osteoporosis, al ser un síndrome complejo, tanto los factores ambientales como el componente genético, juegan un rol importante en la determinación de la masa ósea.

Por otro lado, diversos trabajos se han enfocado a estudiar la posible asociación entre el desarrollo de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas y polimorfismos en numerosos genes con resultados diversos y la mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo principalmente en poblaciones sajonas y asiáticas e incluso entre poblaciones del mismo origen étnico (p.e. Caucásico), con resultados de asociación diversos, lo anterior debido a las diferencias en el acervo genético y a los factores ambientales que interactúan. En México, las poblaciones tienen un acervo genético distinto, determinado por el mestizaje que se dio entre las distintas etnias mexicanas con los españoles y algunos grupos de origen africano. En estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en diversas poblaciones indígenas de las regiones norte, oeste y sureste de la República Mexicana, se ha observado que algunos polimorfismos presentan distribuciones diferentes con respecto a lo publicado en poblaciones caucásicas y asiáticas. Lo anterior sugiere, que dependiendo de las poblaciones humanas en estudio, los mismos marcadores genéticos vinculados con el desarrollo de una enfermedad podrían asociarse en forma diferente. Con base en lo anterior, es importante el llevar a cabo el estudio de asociación de los diferentes polimorfismos descritos, con presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano. Asimismo, el llevar a cabo este estudio y de encontrar asociaciones significativas, permitiría establecer un riesgo diferencial en dichas mujeres y por ende modificar su vigilancia y tener impacto en la economía.

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La osteoporosis es una enfermedad del sistema esquelético caracterizada por una disminución en la densidad mineral ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que se traduce en un incremento en la fragilidad ósea y un riesgo aumentado de presentar fracturas. Cuando la patología es grave, las fracturas resultan de un traumatismo leve y son frecuentemente referidas como fracturas por fragilidad<sup>1-5</sup>.

Este síndrome probablemente ha existido a lo largo de la historia de la humanidad, pero sólo en años recientes se ha catalogado como un gran problema de salud debido al incremento en la expectativa de vida. En 1940, Albright describió la osteoporosis posmenopáusica y propuso que ésta era consecuencia de una disminución en la formación de los huesos, secundaria a la ausencia de estrógenos<sup>6</sup>.

Posteriormente, se propuso que existían dos formas de osteoporosis: la relacionada con la menopausia por deficiencia de estrógenos y aquella relacionada con la deficiencia de calcio y con la edad<sup>7</sup>. Actualmente, se considera que la osteoporosis representa un continuo, en el cual múltiples mecanismos patogénicos convergen para causar la pérdida de la masa ósea<sup>8</sup>.

### Epidemiología

La prevalencia de osteoporosis y la incidencia de fracturas por la misma, varían de acuerdo con la edad, sexo y el grupo étnico<sup>1</sup>. Se estima que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 8 hombres mayores de 50 años están en riesgo de sufrir alguna alteración de la densidad mineral ósea<sup>9</sup> la prevalencia estimada de fracturas por osteoporosis es del 35% al 50% en mujeres mayores de 50 años<sup>9-12</sup>. En México, la información acerca de la prevalencia de osteoporosis y fracturas es escasa, de acuerdo a la OMS, se estima que alrededor de un millón de mujeres Mexicanas podrían tener osteoporosis<sup>13</sup>, lo

cual representa alrededor del 15% de las mujeres de 50 años o más. Murrillo-Urbe y cols., en 1999, estimaron la incidencia de osteoporosis en mujeres de origen étnico Mexicano de 50 años de edad, y determinaron que el 16% de ellas presentaban osteoporosis y un 57% osteopenia<sup>30</sup>. En otro estudio poblacional llevado a cabo por Clark y cols., en el 2005, describieron que la probabilidad de que a los 50 años de edad de presentar fractura de cadera en la población Mexicana, es del 8.5% en mujeres y del 3.8% en hombres; sin embargo, la prevalencia de fractura de cadera en dicho estudio, no se puede relacionar completamente que sea secundaria a osteoporosis, debido a que no realizaron estudios de medición de la densidad mineral ósea. Por otra parte, la Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (AMMOM) y la Fundación Internacional de la Osteoporosis (OIF), estiman que el 20% de las mujeres mexicanas mayores de 50 años, han presentado fracturas vertebrales atribuibles a desmineralización ósea y la tasa aumenta exponencialmente con la edad<sup>14</sup>.

## Clasificación

La osteoporosis puede dividirse en primaria y secundaria<sup>1, 15</sup>, la primaria puede presentarse en la mujer después de la menopausia y en el varón en etapas más tardías de la vida; mientras que la secundaria puede ser debida a el uso de algunos medicamentos (p.e. el uso crónico de glucocorticoides), así como por la presencia de otras patologías (p. e. hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario, etc).

## Fisiopatología

En la forma común de este síndrome, la reducción en la masa ósea es generalizada, en donde tanto el hueso cortical como el trabecular (figura. 1) están comprometidos (aunque no siempre de igual forma). El déficit óseo resulta de un desequilibrio en la relación normal entre la formación y la reabsorción ósea, lo que da lugar a poca formación ósea o a un aumento en su pérdida o ambos. El efecto en el hueso cortical se traduce en un adelgazamiento de la corteza<sup>17, 18</sup> e incremento de la

porosidad intracortical<sup>17,19</sup>; por otra parte, el efecto en el hueso trabecular (figura. 2), se traduce como un adelgazamiento trabecular<sup>17-20</sup>, así como en pérdida de la conexión del mismo<sup>21</sup>.



Figura 1. Hueso trabecular normal.

Tomado de: Zanchetta José, 2001 <sup>107</sup>

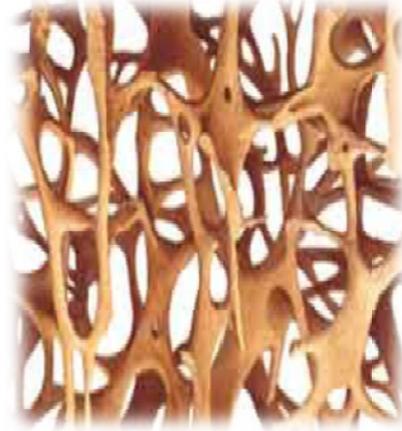


Figura 2. Hueso trabecular osteoporótico

Tomado de: Zanchetta José, 2001 <sup>107</sup>

El principal factor determinante de la masa ósea en los adultos mayores (quienes son las principales personas en padecer osteoporosis) son el pico de masa ósea y la velocidad de pérdida ósea relacionada con la edad<sup>22</sup>.

La disminución de la masa ósea con el consecuente aumento de su fragilidad puede ocurrir debido a:

- 1) Inadecuado pico de masa ósea.

Los estudios llevados a cabo en gemelos sugieren que más del 85% de las variaciones en el pico de masa ósea, son determinados por factores genéticos<sup>23-25</sup> pero, dichos factores probablemente juegan un papel menos importante en determinar la incidencia de fracturas en personas de edades avanzadas<sup>26</sup>. Se han analizado polimorfismos en diversos genes, con el fin de establecer su posible

participación en la determinación del pico de masa ósea, remodelamiento y riesgo de presentar fracturas<sup>27-30</sup>; sin embargo los resultados han sido inconsistentes.

## 2) Incremento en la reabsorción ósea.

Una vez que se ha alcanzado el pico de masa ósea, dicha masa generalmente permanece estable por años debido a que la formación y la reabsorción son iguales. A pesar de lo anterior existe una fase acelerada de pérdida ósea que caracteriza a la osteoporosis posmenopáusica, y tiene lugar en los 10- 15 años siguientes a la menopausia. El ritmo suele ser más acelerado en los primeros 4- 8 años (2-3 % de pérdida de masa ósea/año), para enlentecerse después y puede comenzar ya en la fase de premenopausia. El déficit hormonal (sobre todo el estrogénico), determina que la resorción esté incrementada, de modo que la formación no puede compensar ese ritmo. Afecta al hueso trabecular donde el remodelado óseo es más rápido, por lo que se manifiesta fundamentalmente por fracturas vertebrales y del antebrazo distal. Sin embargo, la pérdida ósea en mujeres (en especial en la parte distal del radio) puede presentarse aún antes de la menopausia, como se puede observar con el aumento en la incidencia de fractura tipo Colles en mujeres alrededor de los 40 años<sup>22, 31</sup>.

La reabsorción ósea excesiva probablemente refleja un incremento en el número de sitios de reabsorción más que un incremento en la cantidad de hueso reabsorbido en cada sitio<sup>15</sup>.

## 3) Disminución en la formación ósea.

La masa ósea del esqueleto se incrementa durante la pubertad y durante la vida del adulto joven, a pesar de que la velocidad de reabsorción es alta pero existe una disminución de la formación ósea por déficit de reclutamiento osteoblástico, en presencia de un grado normal de resorción. Esta pérdida ósea comienza a partir de los 40 años, continua a lo largo de toda la vida y alcanza su

máxima expresión a partir de los 70 años. Afecta tanto al hueso cortical como trabecular y se asocia con más frecuencia a fracturas de cadera.

A si que la pérdida ósea relacionada con la edad y con la menopausia, debe ser consecuencia de un deterioro relativo en la formación ósea. Con la edad disminuye la cantidad de masa ósea que se forma por cada unidad estructural ósea. Esto se evidencia por una disminución en el promedio del grosor de las paredes y tal disminución quizá sea debida al declive de los factores de crecimiento del sistema esquelético relacionados con la edad<sup>15</sup>.

Una característica clave de la osteoporosis es la reducción en la fuerza ósea, que a su vez es una característica compleja determinada por diversas clases de fenotipos: densidad mineral ósea (DMO), tamaño del hueso, así como la geometría y la estructura<sup>32</sup>.

La fuerza del hueso ó fuerza ósea refleja básicamente la integración de la densidad ósea y de la calidad ósea. La densidad ósea se expresa como gramos de mineral por área o volumen. La calidad ósea se refiere a la arquitectura, recambio o daño acumulado (por ejemplo, microfracturas) y a la mineralización<sup>33-37</sup>.

## Menopausia

La menopausia es el cese permanente de la menstruación como resultado de la pérdida irreversible de la unidad funcional del ovario (folículos), lo que da lugar al cese de la ovulación y a la producción de estrógenos<sup>38</sup>. La edad promedio de la menopausia es de 51 años y se ha observado que la edad de la misma es determinada en parte por factores genéticos, ya que madre e hijas (de la misma familia) tienden a presentar la menopausia a la misma edad<sup>38-41</sup>; sin embargo, numerosos factores ambientales pueden modificar la edad de la misma<sup>42,43</sup>.

La alteración endocrina más dramática de la menopausia es la disminución de las concentraciones de estrógenos ( $< 20$  pg/mL), por lo que la velocidad de producción y los niveles circulantes de estradiol en la postmenopausia, son insuficientes para dar apoyo al tejido óseo<sup>44</sup>. El papel central de la deficiencia de estrógenos en la patogénesis de la osteoporosis en la mujer posmenopáusica ha sido reconocido desde hace muchos años<sup>44</sup>. Los estudios morfológicos y la medición de ciertos marcadores bioquímicos llevados a cabo en mujeres posmenopáusicas, muestran que tanto los marcadores de formación, como de reabsorción ósea se encuentran aumentados, lo que indica que el remodelamiento óseo se encuentra acelerado<sup>45, 46</sup>.

El desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas está en función tanto de la edad avanzada como por la deficiencia de estrógenos; sin embargo, alrededor del 75% de la pérdida ósea en esas mujeres durante los primeros 15 años, son atribuibles a la deficiencia de estrógenos más que a la edad en sí<sup>47,48</sup>. Posterior a los 20 años del cese de la producción de estrógenos por parte de los ovarios, las mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, presentan una reducción del 50% del hueso trabecular (vertebra y muñeca) y un 30% de pérdida de hueso cortical; siendo las vértebras especialmente vulnerables debido a que el hueso trabecular de los cuerpos vertebrales son muy activos metabólicamente y ésto disminuye dramáticamente en respuesta a la deficiencia de estrógenos<sup>46- 48</sup>.

### **Fracturas secundarias a osteoporosis (Fracturas por Fragilidad)**

Las fracturas por osteoporosis son la principal causa de morbilidad en la población con dicha patología. La fractura en las vértebras es el sello distintivo de la osteoporosis y por lo tanto la más común, le siguen en frecuencia la cadera, la parte distal del antebrazo y la parte proximal del húmero<sup>9, 49 - 53</sup>. La probabilidad de que las mujeres posmenopáusicas presenten fracturas en uno de los sitios anteriores, excede el de cáncer de mama (aproximadamente del 12%), y la probabilidad de

dichas fracturas en mujeres que viven en países desarrollados es del 40%<sup>51, 52</sup>. Las mujeres posmenopáusicas con fracturas por osteoporosis, además de presentar una disminución en su supervivencia<sup>53-55</sup>, presentan un riesgo aumentado de sufrir futuras fracturas vertebrales, así como de cadera y otras fracturas no espinales<sup>56, 57</sup>. Asimismo, las fracturas vertebrales causan dolor crónico de espalda, limitación en las actividades comunes de la vida diaria, lo cual se traduce en una reducción en la calidad de vida<sup>58</sup>.

Se considera que la fractura de cadera además de las consecuencias económicas está particularmente asociada con profunda discapacidad y secuelas psicosociales, ya que el 50% de los individuos que presentan este tipo de fractura, pierden la capacidad para caminar sin asistencia y el 25% de ellos posterior a la fractura, requerirán cuidados especiales en su domicilio<sup>59</sup>.

La DMO (densidad mineral ósea) baja es el principal factor de riesgo para desarrollar fracturas por osteoporosis y la fractura osteoporótica es el resultado de un trauma a un hueso cuya fuerza está comprometida y el evento traumático puede ser tan simple como levantarse e inclinarse, hasta caídas de mayor impacto. Se considera el traumatismo de baja energía, como el mecanismo de lesión de fractura más frecuente en los pacientes mayores y este traumatismo de baja energía puede ser directo o indirecto. En el traumatismo directo, la caída es sobre el trocánter mayor o existe rotación externa forzada de la extremidad inferior, que en forma secundaria produce un choque del cuello del fémur osteoporótico contra el labio posterior del acetábulo; es decir, la caída produce la fractura. En el caso del traumatismo indirecto, es la contracción muscular la que supera la fuerza del hueso causando en forma secundaria una fractura<sup>60</sup>.

## Factores de Riesgo

La osteoporosis es un síndrome complejo en el cual numerosos factores de riesgo ambientales como son la dieta, estilo de vida, medicamentos, actividad física (entre otros) así como diversas enfermedades, frecuentemente se combinan e interactúan<sup>4</sup>.

Los factores de riesgo que pueden causar disminución en la DMO incluyen el género femenino, la edad, deficiencia de estrógenos, grupo étnico caucásico, bajo índice de masa corporal así como de peso, antecedentes familiares de osteoporosis, tabaquismo, historia de fracturas anteriores, así como menopausia tardía y menopausia temprana<sup>4, 44</sup>. Por otra parte, los estudios de asociación de bebidas alcohólicas o con cafeína y disminución en la DMO, han dado resultados inconsistentes<sup>61-63</sup>. Por el contrario, la actividad y la función física se han asociado con un aumento en la DMO<sup>64</sup>. Asimismo, existen diversos factores de riesgo genéticos que se han asociado al desarrollo de osteoporosis, los cuales se explicarán con detalle más adelante<sup>4</sup>.

## Factores genéticos

Los estudios llevados a cabo en familias y en gemelos han demostrado que los factores genéticos contribuyen aproximadamente del 60 al 85% de las variaciones en la DMO<sup>65-70</sup>.

A partir del primer estudio de osteoporosis llevado a cabo en humanos, en relación de la asociación de la masa ósea, fragilidad y polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D (VDR), se han propuesto más de 30 genes candidatos que quizá juegan un rol en la masa ósea y fragilidad<sup>71,72</sup>. Sin embargo, los resultados de esos estudios son contradictorios, probablemente debido en parte, por el tamaño de muestra inadecuado (por lo general pequeño) y por las diferencias en el acervo genético tanto de los controles como de los sujetos con osteoporosis<sup>72</sup>.

Asimismo, se ha postulado que los factores genéticos juegan un rol importante en el desarrollo de fracturas de la cadera, ya que las hijas con historia materna de fractura en la cadera, les confiere un

riesgo incrementado de dos veces de presentar fractura en edad avanzada, y que es independiente de otros factores de riesgo, incluyendo la DMO<sup>31, 73</sup>.

### **Polimorfismo en el gen del *Receptor de Estrógenos $\alpha$* (*ESR1* o *ESR- $\alpha$* )**

En las mujeres posmenopáusicas la deficiencia de estrógenos es una de las causas principales para el desarrollo de osteoporosis<sup>44</sup>. Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la deficiencia del *ESR1* (al igual que la deficiencia de estrógenos) se traduce en una disminución en la DMO, así como a una pérdida ósea acelerada con la consiguiente presencia de osteoporosis e incremento en el riesgo de presentar fracturas<sup>44, 74-78</sup>. Además, la importancia que tiene el *ESR1* en el metabolismo óseo de ambos sexos, se confirmó con la presencia de mutaciones en el *ESR1* en hombres jóvenes, lo que resultó en una resistencia a los estrógenos con la consiguiente disminución en la masa ósea y retraso en la maduración del esqueleto<sup>79</sup>.

El gen *ESR1*, codifica para receptor de estrógeno, el cual pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares y está distribuido en casi todos los tejidos del organismo, este gen se comporta como regulador de la transcripción del ADN, así la asociación del ligando a su receptor promueve su unión a una secuencia específica del ADN denominada elementos de respuesta a estrógenos (ERE), que se localiza en las regiones promotoras de los genes diana. A los ERE se une una serie de proteínas coreguladoras, llamadas proteínas de interacción con receptores nucleares (NRIP1), capaces de activar o reprimir la transcripción. El gen *ESR1* se expresa en los osteoblastos, osteoclastos y células estromales, por lo que es el principal receptor que media la acción estrogénica en el hueso y tiene una importancia primordial en la regulación de su remodelado.

El gen del *ESR1* o *ESR- $\alpha$*  en el humano se localiza en 6q25.1 y codifica para una proteína de 595 aminoácidos (OMIM: +133430), está formado por 8 exones y 7 intrones, y en su estructura se han

descrito varios lugares sobre los que asientan distintos polimorfismos, los más importantes están en las regiones promotora, las que determinan el inicio de su transcripción.

La mayoría de los estudios del gen *ERS1* se han dirigido a dos regiones polimórficas: *Xbal* [dbSNP: rs9340799] y *PvuII* [dbSNP: rs2234693] del intrón 1. En estos estudios, han encontrado en una población japonesa, que las pacientes mayores de 60 años y la región polimórfica *Xball* por si sólo o en combinación con *PvuII*, estaban significativamente asociados con la DMO de cuello femoral<sup>80</sup>. En otro estudio de meta-análisis llevado a cabo por el grupo de Ioannidis y cols., en el 2004, encontraron que las regiones polimórficas *Xbal* y *PvuII* del *ESR1* se asoció a la presencia de fracturas por osteoporosis<sup>103</sup>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los resultados contradictorios de los estudios de asociación de las diferentes regiones polimórficas descrito en el marco teórico con la presencia de fracturas secundarias a osteoporosis (fracturas por fragilidad) y de que el acervo genético de nuestras poblaciones, determinada por el mestizaje es diferente a otras poblaciones del mundo e incluso entre nuestras propias poblaciones, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

1. ¿Los genotipos de las regiones polimórficas rs9340799 (corte *Xba*I) y rs2234693 (corte *Pvu*II) en el gen *ESR1* se encuentran asociados con la presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano?

## HIPÓTESIS

Las mujeres posmenopáusicas que presentan fracturas por fragilidad de origen étnico Mestizo-Mexicano, presentaran algún(os) genotipo(s) de las regiones polimórficas (rs9340799, rs2234693) en el gen *ESR1* que predisponen al desarrollo de dicha patología.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar si algún(os) genotipo(s) en el gen *ESR1* se asocia(n) a un mayor riesgo de presentar fractura(s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar si los genotipos de la región polimórfica rs9340799 (corte *Xba*I) en *ESR1*, se asocia con la presencia de fractura(s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano.
2. Analizar si los genotipos de la región polimórfica rs2234693 (corte *Pvu*II) en *ESR1*, se asocia con la presencia de fractura (s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano.

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Tipo de estudio: Observacional, prolectivo, transversal y comparativo.

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron a mujeres posmenopáusicas (mujeres con ausencia de menstruación de más de 12 meses), sin fracturas (controles), y mujeres posmenopáusicas con fracturas por fragilidad (casos), todas ellas de origen étnico mestizo-Mexicano (dado por al menos tres generaciones de la familia en este país y que no se encontraban relacionadas biológicamente entre sí).

Para este estudio, las mujeres posmenopáusicas sin fracturas (controles) fueron reclutadas en los Hospitales Regionales Darío Fernández y Tacuba así como del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE y las mujeres posmenopáusicas con fracturas por fragilidad fueron reclutadas de los Hospitales Regionales Darío Fernández y Tacuba del ISSSTE y del Hospital de Traumatología Victoriano de La Fuente Narváez, del IMSS.

## CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE MUJERES POSMENOPÁUSICAS CON FRACTURAS POR FRAGILIDAD:

1. Que aceptaran participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado (Anexo 1).
2. Que se demuestre con el estudio de absorciometría por rayos X de energía dual (DEXA) presencia de osteoporosis (ver apartado de diagnóstico).
3. Que sean de origen étnico mestizo-mexicano.
4. Cese de menstruación de más de 12 meses.
5. Que se compruebe la presencia de la fractura (por fragilidad es decir por traumatismos leves) con las radiografías pertinentes.

## CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE MUJERES POSMENOPÁUSICAS CON FRACTURAS POR FRAGILIDAD:

1. Mujeres posmenopáusicas que hayan tomado por largo tiempo fármacos que pueden afectar el recambio óseo (corticoesteroides, anticonvulsivantes o heparina).
2. Mujeres con antecedente quirúrgico de histerectomía.
3. Antecedentes de fracturas personales y familiares frecuentes antes de los 50 años.
4. Enfermedad de Paget's ósea, osteomalacia, osteogénesis imperfecta.
5. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades que afecten el metabolismo óseo (relacionadas con alteraciones de la hormona paratiroides, diabetes mellitus, enfermedades hepáticas, falla renal y displasias óseas).
6. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo de la vitamina D.
7. Ooforectomía bilateral antes de los 45 años de edad.
8. Insuficiencia ovárica prematura.
9. Hipogonadismo hipogonadotrópico.
10. Fracturas secundarias a traumatismos severos (accidentes por motos, autos, patines, etc).

## CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Que no hayan llenado el cuestionario de factores de riesgo para osteoporosis.
2. Que no se compruebe por rayos X, el diagnóstico de fractura.
3. Que no se haya realizado su estudio de DEXA.

## VARIABLES:

### ➤ EPIDEMIOLOGICAS

Edad, peso, talla, IMC (índice de masa corporal), número de gestas, menarca, menopausia, ingesta de alcohol, tabaco, café, refresco de cola, leche, queso, consumo de calcio y ejercicio frecuente.

➤ DMO por DEXA

DMO (g/cm<sup>2</sup>) de columna, T score columna, DMO (g/cm<sup>2</sup>) de cadera, T score cadera, DMO (g/cm<sup>2</sup>) cuello de fémur, cadera trocánter, Intertrocánterica.

➤ GENETICA

Gen *ESR1* o *ESR-α* (número de acceso al banco de genes: NC\_000006.10). Con dos polimorfismos estudiados:

SNP: rs9340799 marcador: *XbaI*

SNP: rs2234693 marcador: *PvuII*

## Metodología para el diagnóstico de osteoporosis

A todas las mujeres posmenopáusicas se les realizó una densitometría ósea de dos regiones por el método de absorciometría por rayos X de energía dual (DEXA) (cabeza de fémur y de las vértebras lumbares) con el fin de corroborar el diagnóstico de osteoporosis o de ausencia del mismo. El estudio de la DMO por DEXA para las mujeres posmenopáusicas que ingresaron a este estudio, se realizó por un técnico certificado por “The International Society for Clinical Densitometry” específicamente por “Clinical Densitometrist”, asimismo el equipo se encontraba certificado y de acuerdo con los controles de calidad requeridos.

Se les aplicó un cuestionario en donde se recabó información de la presencia de factores de riesgo, que incluyó al cuestionario de Albrand modificado<sup>81</sup>, así como los datos del índice clínico predictivo validado<sup>82</sup> y la firma de la carta de consentimiento.

El diagnóstico de osteoporosis se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la OMS<sup>82-86</sup>, para mujeres Latinoamericanas.

El diagnóstico se basó en cuatro categorías para evaluar la DMO utilizando el método de DEXA:

- 1) Normal: DMO con puntaje de  $T$  que va desde +1 hasta -1 desviación estándar (DE) comparado con el promedio para adulto joven.
- 2) Osteopenia (masa ósea baja): DMO con puntaje de  $T$  que va desde -1 hasta -2.5 DE (desviación estándar) comparado con el promedio para adulto joven.
- 3) Osteoporosis: DMO con puntaje de  $T$  que se encuentra por debajo de -2.5 DE comparado con el promedio para adulto joven.
- 4) Osteoporosis severa (osteoporosis establecida): DMO con puntaje  $T$  que se encuentra por debajo de -2.5 DE comparado con el promedio para adulto joven y existen fracturas atribuidas a fragilidad ósea.

El valor de  $T$  se define como el número de DE por arriba o por debajo del valor promedio de la DMO comparado con el valor de mujeres jóvenes sanas de Latinoamérica<sup>1, 84- 86</sup>.

Con el método actual de la DEXA se evaluaron dos regiones corporales: la columna lumbar de L1 a L4 y la cadera, incluyendo el cuello femoral, el triángulo de Ward, el trocánter mayor y la cadera total. Los resultados se presentan visualmente incluyendo el puntaje  $T$  que se usa para comparar con población joven normal<sup>83</sup>. En las mediciones de la cadera, el cuello femoral y la cadera total son las más útiles para predecir fractura, mientras que la medición del triángulo de Ward tiene poco valor clínico por sus amplias variaciones<sup>51, 52</sup>.

Por otra parte se incluyeron para este proyecto mujeres posmenopáusicas con fractura por osteoporosis sólo en vértebras o en cadera (trans e inter-trocánter); asimismo, se llevó a cabo el

análisis estratificado por región anatómica, con el fin de establecer si una fractura específica se asoció a un polimorfismo determinado.

El diagnóstico de fractura de se llevó a cabo con valoración de radiografías.

## Metodología experimental

### Extracción de ADN de sangre periférica.

Se tomaron muestras de 5 mL, de sangre venosa, para la posterior extracción del ADN. La técnica para la extracción del mismo se basó en la descrita por John y cols. (1991)<sup>87,88</sup> con algunas modificaciones:

#### *Material y reactivos*

- Tubo Vacutainer de 5mL con anticoagulante EDTA (etilen diamino tetra acetato disódico) 0.5 M, pH 8
- Sacarosa- Triton 2X frio (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, MgCl<sub>2</sub> 0.01M y Tritón 100X al 2%)
- Agua desionizada fría(ddH<sub>2</sub>O)
- NaCl 5mM
- NaCl sobresaturada (5M)
- Etanol al 70%
- Etanol absoluto
- Sulfato dodecílico sódico (SDS) al 10%

#### *Equipo*

- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Vortex

## *Método*

La sangre se depositó en un tubo de 5 mL que contenía (EDTA) como anticoagulante, de inmediato la muestra fue colocada en hielo; se centrifugó por 10 minutos a 2300 rpm, al separarse el plasma del paquete celular éste se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur, posteriormente se recuperó la capa de leucocitos del paquete celular.

Para llevar a cabo la lisis de membrana celular, se transfirieron los leucocitos a un tubo que contenía 2mL de sacarosa- triton 2X fría y 1mL de agua desionizada fría; se agitó y se dejó en reposo a 4 °C por 10min, posteriormente se centrifugó a 10 min por 2300rpm, en seguida se decantó el suero, y se recuperó el botón de leucocitos; para lavar los leucocitos (núcleos) se agregó 1mL de sacarosa-tritón 2X fría y 1mL de agua desionizada fría, después se agitó, para después ser centrifugado a 2300rpm por 10min; asimismo el suero se decanto y el sobrenadante se lavó de 2 a 3 veces de la forma anterior, hasta que se obtuvo un botón nuclear libre de hemoglobina.

Posteriormente a los núcleos se les añadió 72  $\mu$ L de NaCl 5mM, se agitó; con ayuda de una pipeta Pasteur se recuperó el botón y se pasó a un microtubo, para lisar los núcleos (leucocitos) se agregó 36  $\mu$ L de SDS al 10%, se agitó y se mantuvieron las muestras en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente, después para precipitar a las proteínas y eliminarlas del ADN se agregó 247  $\mu$ L de NaCl saturado, se agitó, se incubó a temperatura ambiente por 5min, se centrifugó 14000rpm por 10min a 4°C, y, el sobrenadante se transfirió a otro microtubo, lo anterior con el fin de precipitar el ADN, al precipitarse se tomó el botón con una pipeta Pasteur y se llevó a otro microtubo, se agregó 1mL de etanol al 70 % frío y se centrifugó a 14000rpm por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1mL de etanol frío al 70%,centrifugando a 14000 rpm por 3 minutos; finalmente, se dejó secar el botón a temperatura ambiente y posteriormente fue resuspendido en ddH<sub>2</sub>O, almacenándose a -20°C para su análisis posterior.

## Determinación de la concentración del ADN

Posterior a la extracción del ADN de las muestras, se procedió a su cuantificación, el cual se basa en la tecnología que emplea la tensión superficial para mantener la muestra adherida a una pequeña superficie en la cual se mide la concentración del ADN<sup>89</sup>.

### *Material y reactivos*

- Micropipeta de 10  $\mu\text{L}$
- Agua desionizada
- Puntas de polipropileno con capacidad para 10  $\mu\text{L}$
- Paño

### *Equipo*

- Vortex

### *Instrumento*

- Espectrofotómetro NANODROP ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

## Método.

Se inició limpiando las superficies ópticas del sistema de retención de muestras del equipo, en él se colocó con ayuda de una micropipeta, 2 $\mu\text{L}$  de agua desionizada, en la superficie óptica interior, se cerró el brazo de muestreo, asegurándose que el pedestal superior entrara en contacto con el agua desionizada, se levantó el brazo de muestreo y se limpió ambas superficies ópticas con un paño limpio y seco.

Se abrió el Software del Nanodrop y se seleccionó la aplicación de ácidos nucleicos, asimismo se eligió la constante para calcular la concentración (ADN- 50) apropiada para ADN de doble cadena y se realizó una medida en blanco con 2 $\mu\text{L}$  agua desionizada y se limpió ambas superficies ópticas con un paño

limpio y seco. Posteriormente con el brazo de muestreo elevado, se cargó 2 $\mu$ L de la muestra bien resuspendida en el pedestal de medida inferior; se bajó el brazo de muestreo y el pedestal superior se aproximó a 1mm del inferior. En ese momento la muestra depositada en el pedestal inferior estableció contacto con el superior y se formó un puente líquido entre ambos pedestales.

Para la medida espectral, se seleccionó la medida en la aplicación del software y los dos pedestales se aproximaron a 0.2mm y una lámpara de xenón proporcionó la luz que fue analizada por el espectrofotómetro después de que atravesó la muestra, al finalizar la medida se levantó el brazo de muestreo, se retiró la muestra de ambos pedestales usando un papel secante. El software calculó automáticamente la concentración de ácido nucleico y los rangos de pureza; en seguida se revisó la calidad espectral donde se evaluó la pureza de la muestra; la cual fue analizada con la calidad de espectro general:

$260/280 = 1.8 - 2.0$ . Una relación menor, indica impureza del ADN generalmente por la presencia de proteínas y una mayor a 2.0 es por presencia de fenol u otros contaminantes.

$260/230 = 1.8 - 2.2$ . Esta relación fue una segunda medida de pureza del ADN en la cual, valores debajo de este rango pudieron indicar una mala técnica de purificación.

El proceso de cuantificación se realizó por duplicado con cada muestra para comprobar si las muestras estaban bien resuspendida. Si se observó una variación superior a 10ng/  $\mu$ L entre las dos medidas, la muestra fue resuspendida y cuantificada de nuevo. La concentración final del ADN de una muestra se obtuvo calculando la media aritmética de los datos de las dos medidas.

## Determinación de la calidad del ADN

Para conocer la calidad de las muestras se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Este método se basa en la migración de las muestras a través de un gel, en el cual por acción de un campo eléctrico, fueron separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular y la carga neta que poseía<sup>90</sup>. Al ser muestras de ácidos nucleicos, el grupo fosfato fue el responsable de que los fragmentos migraran hacia el polo positivo por la fuerte carga negativa a pH neutro; la resolución y velocidad de separación de los fragmentos del ADN por electroforesis fueron reguladas a través de la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado en la electroforesis. La tinción del gel con bromuro de etidio, que es una sustancia fluorescente que se intercaló en la molécula del ADN, y la exposición con luz ultravioleta, permitió observar el resultado de esta migración.

### *Material*

- Micropipetas de 20µL, 200µL y 1 000 µL.
- Lámina extensible de parafilm.
- Puntas de polipropileno con capacidad para 20µL, 200 µL y 1000 µL.
- Peines para las bandejas
- Bandeja para la preparación del gel
- Probetas de 50mL, 100mL y 1000mL
- Matraz Erlenmeyer 250mL

### *Reactivos*

- Bromuro de etidio
- Agarosa grado molecular
- Agua Destilada
- Buffer de resolución stock TBE 5X.
- Buffer de resolución TBE 1X.
- Amortiguador de carga

### *Equipo*

- Cámara de electroforesis horizontal y accesorios.
- Fuente de poder
- Parrilla de calentamiento
- Tras iluminador UV

## Método

Se preparó la bandeja sellando los bordes por presión con cinta adhesiva y se pusieron los peines.

Se pesó 2 gr de agarosa, ésta se colocó dentro de un matraz Elermeyer que contenía 200 mL de buffer TBE 1X y se calentó hasta su completa disolución.

Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura soportable por la mano, se agregó 2  $\mu$ L de bromuro de etidio, se mezcló bien, agitando el matraz en forma circular y evitando que se formaran burbujas en la solución. Posteriormente se vertió la solución lentamente en la bandeja de corrida y se retiraron las burbujas que se quedaron sobre el área de corrida con una punta limpia; se dejó polimerizar la agarosa por espacio de 20 minutos. Después que la agarosa quedó completamente solidificada, se añadió el buffer de electroforesis de TBE 1X entre 0.5 y 1 cm por encima del gel.

Posteriormente a las muestras se les realizó una dilución de 15- 20 ng/mL, de esta dilución se tomaron 5  $\mu$ L de muestra y se pusieron sobre un pedazo de lámina de parafilm, se añadió a cada muestra 1.5 $\mu$ L de amortiguador de carga y se mezcló, posteriormente con ayuda de una pipeta se procedió a cargar las muestras en los pocillos, evitando la contaminación del pocillo contiguo, después se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 75 voltios por 45 minutos y se detuvo la electroforesis hasta que el frente de corrida se localizó en la posición deseada, ya finalizada la electroforesis, se colocó el gel en el equipo tras iluminador UV, y se abrió el software del equipo para la observación de la integridad del ADN.

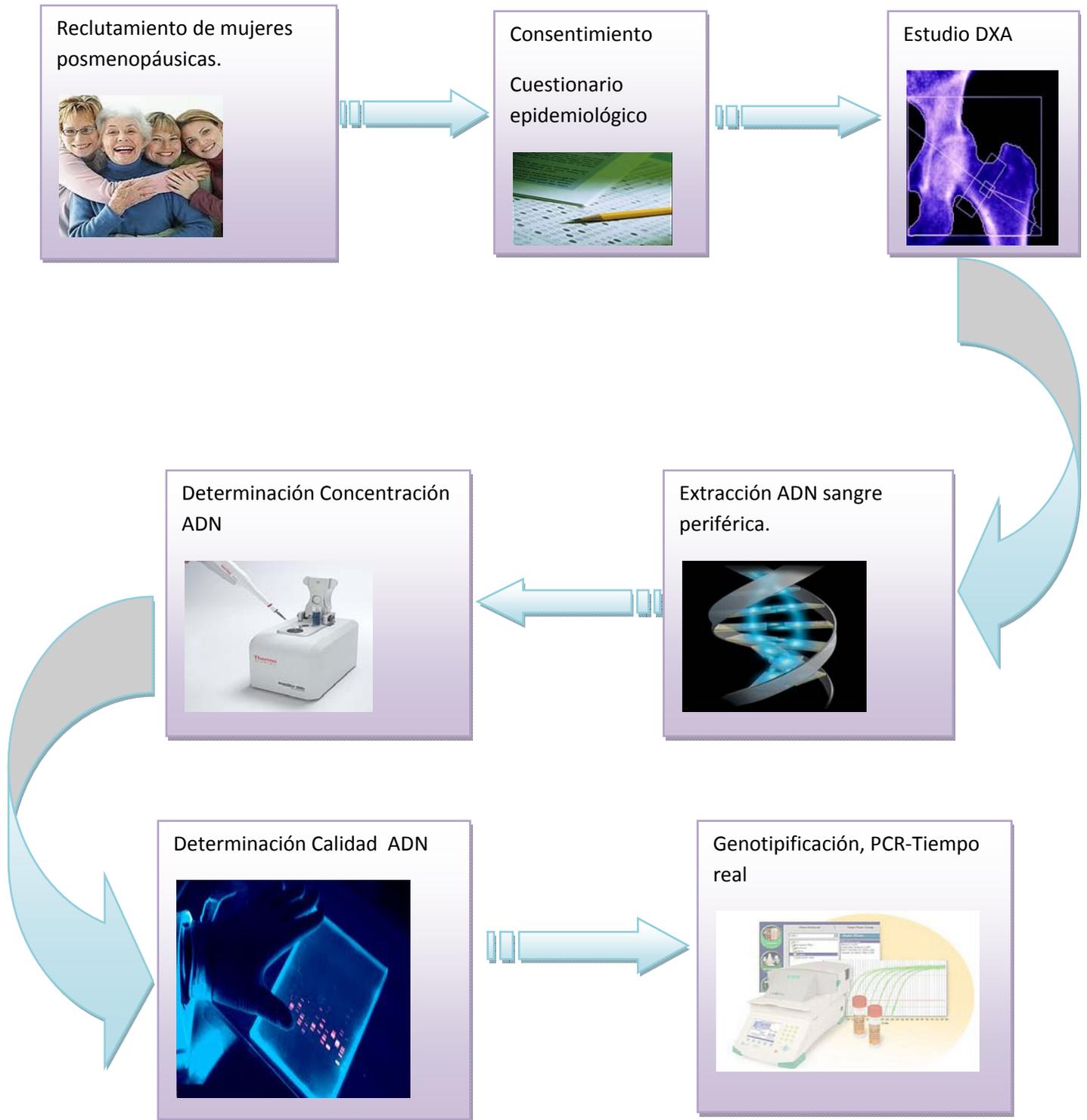
## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real

El análisis de las regiones polimórficas (*PvuII* y *XbaI*) del gen que se estudio en este proyecto, se llevó a cabo por discriminación alélica en PCR en tiempo real (la cual es una variante cuantitativa de la PCR) <sup>91</sup>. Este método se baso en el análisis de genotipificación en punto final <sup>92</sup>.

**Método de Genotipificación:**

El análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) fue desarrollado usando discriminación alélica por PCR en tiempo real, usando ensayos TaqMan (Applied Biosistem). Todas las reacciones de PCR contenían 20ng de ADN, 5µl de Master Mix Universal (AB) (2x), 0.25 µl oligonucleótidos y sondas (10X) y agua para un volumen final de 10 µl. La PCR en tiempo real fue realizadó en un ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems,Foster City,CA,USA) las condiciones para todos los SNP fueron 95°C por 10min y 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 segundos y 62°C por un minuto. En cada ciclo el software determinó la señal de fluorescencia de las sondas marcadas con los fluoroforos VIC o FAM (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA), para la determinación de los SNPs utilizamos sondas y oligonucleótidos diseñados por Applied Biosystems, para el gen *ESR1* estudiamos los polimorfismos rs2234693, ensayo con ID: [C\\_3163590\\_10](#), rs9340799 ensayo con ID: [C\\_3163591\\_10](#).

# DIAGRAMA DE FLUJO



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo en el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), considerando un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

### Estadística descriptiva:

Para las variables cuantitativas se obtuvieron media y desviación estándar, para las variables categóricas se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas. La comparación entre las variables numéricas continuas fue analizada mediante *t de Student*, para examinar la asociación en las variables discretas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  asimismo para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas se utilizó la prueba de  $\chi^2$ .

### Estadística Inferencial:

- ✓ *Asociación de los genotipos de las regiones polimórficas (Xbal y Pvull) y la DMO:* Se investigó en cada genotipo si existe asociación de éstos con la disminución de densidad mineral ósea de columna, usando ANOVA, ajustado por edad, índice de masa corporal (IMC) y edad de menopausia. Asimismo se utilizó la prueba de post hoc (Tuckey) para analizar las varianzas significativas.
- ✓ *Asociación de los genotipos de las regiones polimórficas (Xbal y Pvull) y fracturas por fragilidad:* El antecedente de fractura por fragilidad, presente o ausente se consideró como variable respuesta, así también recodificamos los factores de riesgo clínicos y los SNPs (variables independientes), en variables dicotómicas, de acuerdo a los reportes de la literatura, posteriormente utilizamos el programa SNPStats<sup>94</sup> el cual permitió, mediante regresión logística testar qué modelo de herencia se ajustaba más a las proporciones observadas en casos y controles. Al mismo tiempo este programa proporciono una medida

de asociación basada en la estimación de la razón de momios (RM), al cuantificar cuánto más probable es la aparición de la enfermedad en presencia de determinado genotipo respecto a cuando no está presente.

Para decidir el modelo de herencia más adecuado para las regiones polimórficas, se comparo el ajuste del modelo codominante (el más general), con los demás modelos. Estas comparaciones se realizaron mediante un test de AIC (criterio de información de Akaike) y BIC (criterio de información bayesiano); Los mejores modelos fueron aquellos que presentaron el menor valor de AIC y BIC.

- ✓ *Asociación de Haplotipos de ERS y fracturas por fragilidad:* Utilizamos el programa Haploview 4.2<sup>93</sup>, utilizando la variable respuesta en su forma categórica (Normal vs fracturas osteoporosis), determinando la frecuencia de haplotipos y su asociación con osteoporosis, utilizamos el programa SNPstats<sup>94</sup>, PHASE 2.0.2<sup>95</sup>.

## RESULTADOS

Se analizaron 202 pacientes posmenopáusicas, de las cuales 101 fueron mujeres que presentaron osteoporosis y fracturas por fragilidad (casos) y 101 mujeres sin alteraciones en la DMO y/o fracturas (controles).

Asimismo, se determinó en el grupo de los casos, en que zona del cuerpo estaba presente la fractura por fragilidad, obteniendo; 72% en muñeca, 19% en cadera, 7% en columna y 3% en otra parte del cuerpo (figura 3).

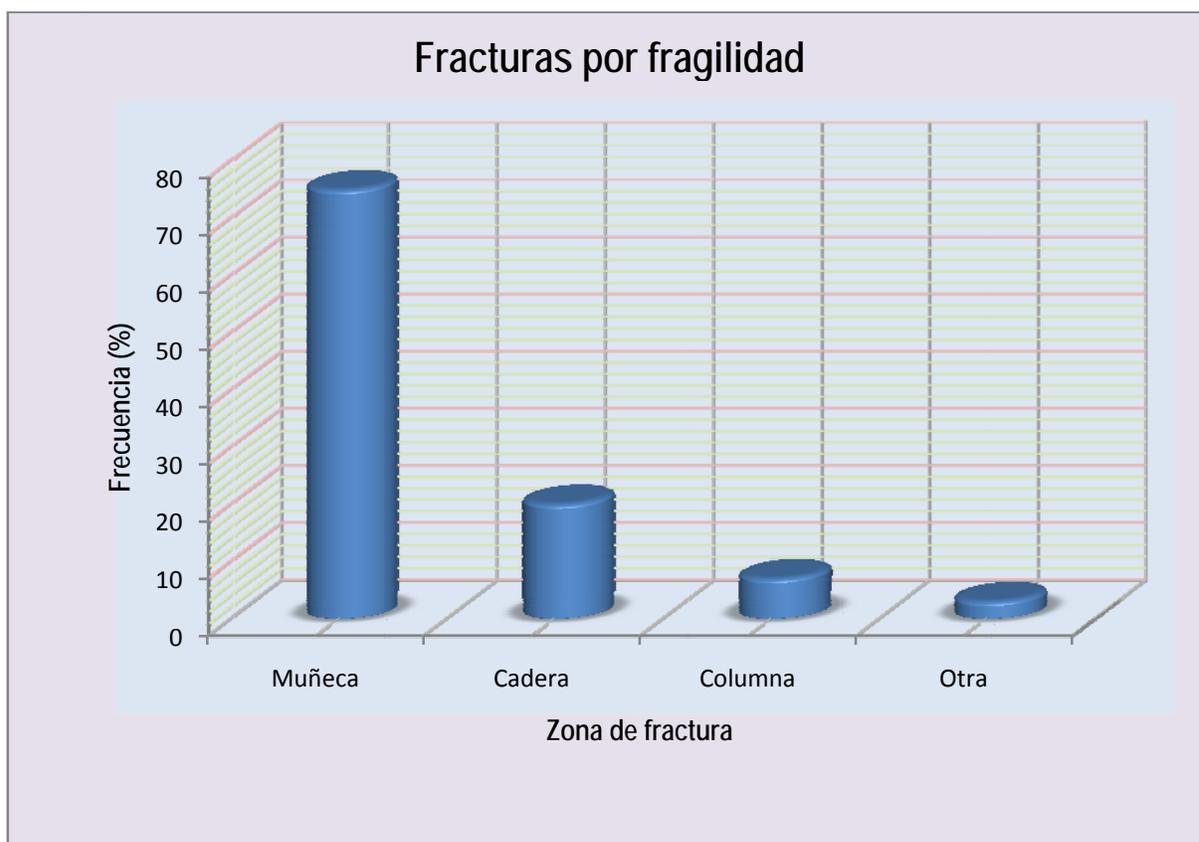


Figura 3. Frecuencia de fracturas en la población de estudio.

Dentro de la población de mujeres posmenopáusicas, se analizaron las características epidemiológicas, las cuales fueron las variables antropométricas y sus características generales; en donde observamos que la edad, el peso, el IMC, la ingesta de calcio y el ejercicio regular, se asociaron en forma significativa a la presencia de osteoporosis (cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Variables antropométricas y características de las mujeres posmenopáusicas. (Media  $\pm$  DE)

Variable	Casos N=101	Controles N=101	Evaluación p*
Edad (años)	64 $\pm$ 8.161	56 $\pm$ 5.661	0.0001
Talla (m)	1.51 $\pm$ 0.056	1.54 $\pm$ 0.052	0.1
Peso(kg)	63.19 $\pm$ 10.249	73.98 $\pm$ 12.083	0.0001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.53 $\pm$ 3.987	31.14 $\pm$ 5.055	0.0001
No. de gestas	4.1089 $\pm$ 2.622	3.405 $\pm$ 1.97	0.3
Menarca (años)	13.26 $\pm$ 1.561	12.544 $\pm$ 1.552	0.1
Menopausia (años)	46.86 $\pm$ 5.142	48.98 $\pm$ 3.792	0.0001

IMC= índice de masa corporal, DE = desviación estándar; \*se utilizó la prueba de *t-Student*;

Cuadro 2. Características generales de las mujeres posmenopáusicas

Hábitos	Casos N=101	Controles N=101	Evaluación p*
Alcohol	4(4%)	2(2%)	0.341
Tabaco	12(11.9%)	20(19.8%)	0.088
Café	70(69.3%)	72(71.3%)	0.439
Refresco de cola	42(41.6%)	32(31.7%)	0.094
Leche	89(88.1%)	91(90.1%)	0.411
Queso	92(91.1%)	92(91.1%)	0.597
Calcio	12(11.9%)	24(23.8%)	0.021
Ejercicio	27(26.7%)	40(39.6%)	0.003

\*Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  (chi-cuadrada).

En nuestra población de estudio, se evaluó la DMO en cada una de las regiones más frecuentes a sufrir fracturas por osteoporosis en las mujeres posmenopáusicas (cuadro 3). Como era de esperarse, las mujeres controles presentaron una DMO mayor (en especial en L2-L4) en comparación con las mujeres posmenopáusicas controles.

Cuadro 3. Densidad mineral ósea (DMO) en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-mexicano. (Media  $\pm$  DE)

Variable	Casos N=101	Controles N=101	Evaluación p*
DMO cuello de fémur (g/cm <sup>2</sup> )	0.6262 $\pm$ 0.0957	0.8510 $\pm$ 0.1055	0.0001
DMO columna lumbar (g/cm <sup>2</sup> )	0.6929 $\pm$ 0.0905	1.0380 $\pm$ 0.0838	0.0001
DMO cadera (g/cm <sup>2</sup> )	0.8036 $\pm$ 0.1506	1.0392 $\pm$ 0.1324	0.0001

DE = desviación estándar; \*se utilizó la prueba de *t-Student*.

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de los genotipos de las regiones polimórficas del gen *ESR1* (*rs934079* de *XbaI* y *rs2234693* de *PvuII*) y su posible relación con fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas.

La frecuencia de los alelos de las regiones polimórficas evaluados para el gen *ESR1*, son descritos en el cuadro 4. Se observó que ambas regiones polimórficas estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que presentaron una  $p > 0.05$ .

Cuadro 4. Frecuencia de alelos, genotipos y equilibrio de Hardy-Weinberg en los polimorfismos *rs9340799* y *rs2234693* del gen *ERS1*

Corte	<i>XbaI</i>			<i>PvuII</i>		
	Numero de referencia SNP	<i>rs9340799</i>		<i>rs2234693</i>		
	Genotipo	N	%	Genotipo	N	%
<b>Distribución Genotípica</b>	GG	7	3	TT	112	55
	AG	96	48	TC	81	45
	AA	99	49	CC	9	5
<b>Frecuencia alélica</b>	A	294	73	T	305	75
	G	110	27	C	99	25
<b>Hardy-Weinberg (H-W)</b>		<b><math>p=0.45</math></b>				<b><math>p=0.34</math></b>

Se evaluó en un test estadístico  $\chi^2$  (chi-cuadrada);  $p > 0.05$  en equilibrio de H-W.

Se analizaron en regiones polimórfica (*PvuII* y *XbaI*), la relación de estos y presencia de fracturas por fragilidad, utilizando diferentes genotipos y sus posibles modos de herencia (cuadro 5 y 6).

En relación con la región polimórfica (*PvuII*) no se observó una asociación significativa con presencia de fracturas por fragilidad ( $P > 0.05$ ) (cuadro 5). No así sucedió para *XbaI*, ya que para el modelo recesivo A/A-A/G G/G hay significancia estadística, es decir el modelo recesivo se relaciona de alguna manera a la patología, mostrando que los individuos G/G están funcionando como protector a fracturas, no así los individuos A/A y A/G, sin embargo no fue posible determinar la Razón de Momios (IC<sub>95%</sub>) ya que la muestra fue muy pequeña y solo se encontró este genotipo en las mujeres

posmenopáusicas controles (6.9%), por lo que fue imposible asociar este genotipo a dicha patología (cuadro 6).

**Cuadro 5. Polimorfismo rs2234693 del corte *Pvull* y su asociación con fracturas por fragilidad**

Modelo	Genotipo	Controles	Casos	RM (IC <sub>95%</sub> )	P*	AIC	BIC
Codominante	T/T	51 (50.5%)	61 (60.4%)	1			
	T/C	47 (46.5%)	34 (33.7%)	0.60 (0.34-1.08)	0.13	274.2	284.2
	C/C	3 (3%)	6 (5.9%)	1.67 (0.40-7.02)			
Dominante	T/T	51 (50.5%)	61 (60.4%)	1			
	T/C-C/C	50 (49.5%)	40 (39.6%)	0.67 (0.38-1.17)	0.016	280.7	287.3
Recesivo	T/T-T/C	98 (97%)	95 (94.1%)	1			
	C/C	3 (3%)	6 (5.9%)	2.06 (0.50-8.49)	0.3	274.1	280.7
Doble dominante	T/T-C/C	54 (53.5%)	67 (66.3%)	1			
	T/C	47 (46.5%)	34 (33.7%)	0.58 (0.33-1.03)	0.062	283.3	289.9

NA= no se analizó, RM= razón de momios, IC<sub>95%</sub> (Intervalo de confianza al 95%). \*Evaluación de p usando regresión logística,  $r^2 = 0.005$ ; para seleccionar el mejor modelo que se ajuste a los datos se utilizó AIC (Criterio de Información Akaike) y BIC (Criterio de Información Bayesiano).

Cuadro 6. Polimorfismo rs9340799 de corte *Xba*I y su asociación con fracturas por fragilidad

Modelo	Genotipo	Controles	Casos	RM (IC <sub>95%</sub> )	P*	AIC	BIC
Codominante	A/A	43 (42.6%)	56 (55.5%)	1			
	A/G	51 (50.5%)	45 (44.5%)	0.68 (0.39-1.19)	0.0028	274.2	284.2
	G/G	7 (6.9%)	0 (0%)	0.0 (0.00-NA)			
Dominante	A/A	43 (42.6%)	56 (55.5%)	1			
	A/G-G/G	58 (57.4%)	45 (44.5%)	0.60 (0.34-1.04)	0.067	280.7	287.3
Recesivo	A/A-A/G	94 (93.1%)	101 (100%)	1			
	G/G	7 (6.9%)	0 (0%)	0.0 (0.00-NA)	0.0016	274.1	280.7
Doble dominante	A/A-G/G	50 (49.5%)	56 (55.5%)	1			
	A/G	51 (50.5%)	45 (44.5%)	1.79 (0.45-1.37)	0.4	283.3	289.9

NA= no se analizó, RM= razón de momios, IC<sub>95%</sub> (Intervalo de confianza al 95%). \*Evaluación de p usando regresión logística,  $r^2 = 0.705$ ; para seleccionar el mejor modelo que se ajuste a los datos se utilizó AIC (Criterio de Información Akaike) y BIC (Criterio de Información Bayesiano).

También, se analizó la posible relación en la disminución de la densidad mineral ósea (DMO) de columna lumbar, para los diferentes genotipos de las regiones polimórficas, encontrado que las pacientes que presentaban el genotipo G/G en la región polimórfica *Xba*I, fueron las que presentaron una mayor DMO con una diferencia mayor de 0.2 g/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.018$ ) con respecto al genotipo A/A (cuadro 7).

Cuadro 7. Densidad mineral ósea de columna lumbar (g/cm<sup>2</sup>) y los genotipos del gen *ERS 1* (*Xba*I y *Pvu*II)

Corte (número de SNP)	Genotipo	Media ± DE	Evaluación de p*	Comparación de genotipos <i>Xba</i> I	Evaluación de p#
<b><i>Xba</i>I</b> (rs9340799)	A/A	0.8325 ± 0.2033	<b>0.001</b>	A/A vs A/G	0.114
	A/G	0.8870 ± 0.1809		<b>A/A vs G/G</b>	<b>0.018</b>
	G/G	<b>1.0361 ± 0.0594</b>		A/G vs A/A	0.114
<b><i>Pvu</i>II</b> (rs2234693)	T/T	0.8419 ± 0.1946	0.104	A/G vs G/G	0.114
	T/C	0.9009 ± 0.1872		<b>G/G vs A/A</b>	<b>0.018</b>
	C/C	0.8399 ± 0.2107		G/G vs A/G	0.114

DE = desviación estándar; se utilizó la prueba de ANOVA\*; prueba de post hoc (Tukey) #.

Debido a que el estudio de los haplotipos tiene un mayor poder discriminante que el estudio de alelos, se procedió a realizar el análisis de los haplotipos de estas dos regiones (*Pvu*II y *Xba*I) y presencia de fracturas por fragilidad, obteniendo cuatro haplotipos (A-T, G-C, G-T y A-C).

Encontrando que el haplotipo G-C se asocia en forma significativa a protección ( $p = 0.016$ ) y se observó lo opuesto para el haplotipo A-C ya que éste, se asocia a la presencia de fracturas por fragilidad (RM = 3.69; I.C. 95% = 1.02-13.27) (cuadro 8). Asimismo, el análisis de ligamiento, determinó que estos haplotipos se encuentran en desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0.075$ ).

Cuadro 8. Haplotipos del gen *ERS1* en los polimorfismos rs9340799 y rs2234693

Bloque	SNP		Frecuencia				
	rs9340799	rs2234693	Total	Casos	Controles	RM <sub>c</sub> (IC <sub>95%</sub> )	P
1	A	T	0.6844	0.7072	0.6618		
2	G	C	0.2017	0.1577	0.2460		
						<b>0.49(0.27 - 0.87)</b>	<b>0.016</b>
3	G	T	0.0706	0.065	0.0758		
						0.72 (0.32 - 1.61)	0.42
4	A	C	0.0434	0.07	0.0164		
						<b>3.69 (1.02 - 13.27)</b>	<b>0.047</b>

$p = 0.0076$  global de los haplotipos;  $D' = 0.75$  desequilibrio de ligamiento. Se consideró una  $p < 0.05$  estadísticamente significativa, RM<sub>c</sub> = razón de momios cruda, IC<sub>95%</sub> (Intervalo de confianza al 95%).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se estudiaron 202 mujeres posmenopáusicas, de ellas 101 representaban los casos, los cuales previamente se les diagnosticó osteoporosis, asimismo se confirmó la existencia de fractura por fragilidad y se determinó en qué zona presentaba la fractura, obteniendo en nuestro grupo de estudio (Figura 3) a 72% de pacientes con fractura en muñeca, 19% en cadera, 7% en columna y 3% en otra parte del cuerpo.

Al ser las fracturas por fragilidad un síndrome complejo en el que influyen tanto los factores ambientales como el componente genético, a todas las mujeres que participaron en este estudio se les realizó un cuestionario de posibles factores que estuvieran relacionados con dicha patología (anexo 2). Como podemos observar en el cuadro 1, el estudio de estos factores fue estadísticamente significativo para las variables antropométricas (edad, peso e IMC). En ella cabe resaltar que las pacientes que presentan fracturas por fragilidad, tienden a una edad mayor con una diferencia de 8 años aproximadamente con respecto a los controles y, efectivamente hay artículos que mencionan que la edad está relacionada con la velocidad de pérdida ósea<sup>22, 42</sup>.

También hay estudios que aseguran que el peso y el IMC, es un importante factor para el desarrollo de fracturas, en ellos, han señalado que un peso menor o igual a 57 kg se asocia a un mayor riesgo de padecer dicha patología, así como, un IMC menor a 19 kg/m<sup>2</sup>.<sup>96</sup> Al parecer esta relación sí estuvo presente en nuestro estudio, pues se observa en el cuadro 1, que el grupo de los casos, presentaban un peso menor, casi de 10 kg de diferencia con respecto a los controles, de igual forma el IMC fue menor con una diferencia de 4 kg/m<sup>2</sup> aproximadamente.

Otras características que probablemente pudieron influir en esta patología fueron, el número de gestas, edad de la menarca y edad de menopausia; de todas las anteriores, sólo la edad de menopausia fue estadísticamente significativa, observando así (cuadro 1) que las pacientes que

representaban los casos, iniciaron a una edad más temprana la menopausia, que el grupo de los controles. Estos datos confirman que los estrógenos juegan un rol importante en el desarrollo de la osteoporosis<sup>76</sup>.

De igual forma se estudiaron los hábitos de las pacientes posmenopáusicas, los cuales fueron menos consistentes (cuadro 2), éstos fueron la ingesta de tabaco, alcohol, café, refrescos de cola, leche, queso, calcio y ejercicio; de todos ellos cabe resaltar a la práctica de ejercicio en forma regular, ya que en con este factor si hubo una diferencia estadísticamente significativa, obteniendo que el grupo de los de los controles realiza mas ejercicio con respecto a los casos, lo cual fue un hábito que pudo repercutir en la protección de fracturas, asimismo muchos autores ha considerado como un alto factor protector para el desarrollo de fracturas de fémur<sup>97</sup>, pues el papel de las fuerzas biomecánica, especialmente la ejercida por contracción muscular, es determinante en el nivel de masa ósea. También, se encontró que la ingesta de calcio fue otro hábito significativo para dicha patología pues al parecer la población que consume calcio regularmente, no presentó indicios de fracturas por fragilidad; aunque hay estudios que indican que, una dieta rica en calcio en la postmenopausia para la prevalencia de fracturas, es un tema todavía controversial ya que el suplemento de calcio tiene un pequeño efecto positivo sobre la (DMO, pero no está claro que reduzca la incidencia de fracturas vertebrales<sup>98</sup>.

Teniendo en cuenta que la masa ósea es un factor importante en la aparición de las fracturas osteoporóticas y de que la masa ósea no es igual en todas las zonas del esqueleto, e incluso que la osteoporosis no afecta por igual a todos los huesos (lo cual confirmamos en nuestro estudio, cuadro 3); consideramos importante realizar un estudio de DEXA que abarcó las zonas más vulnerables de sufrir osteoporosis posmenopáusica como es la cadera, columna lumbar y cuello de fémur (cuadro 3).

En este estudio al igual que en otros descritos en la literatura<sup>10, 99</sup> observamos en nuestra población de mujeres con fracturas por fragilidad posmenopáusica, una disminución de la masa ósea en columna lumbar de alrededor 0.35 g/cm<sup>2</sup> con respecto al grupo control.

Con base en lo anterior, es importante recalcar que la medición de la DMO nos da el parámetro de la presencia de osteoporosis, por tal motivo es importante remarcar que éste último, al ser un parámetro imprescindible para evitar presentar un riesgo aumentado de sufrir fracturas, debe ser realizado en las mujeres que entran a la menopausia en forma basal y al menos cada año.

Una vez identificados los factores confusores asociados a fracturas por fragilidad (cuadro 1 y 2), se procedió a analizar los genotipos de las regiones polimórficas del gen *ERS1* de corte *Xbal* (*rs9340799*) y *PvuII* (*rs2234693*). En el cuadro 4, se puede observar que tanto el SNP de corte *PvuII* como el de corte por *Xbal* se encontraron en EHW ( $p > 0.05$ ). Con respecto a los genotipos se puede observar que para *Xbal* el genotipo más frecuente fue *AA* y el menos frecuente fue *GG*; en caso de *PvuII* el más frecuente fue *TT* y el menos frecuente *CC*, estos resultados coinciden con la literatura<sup>100, 101</sup> (Hap Map), confirmando que para el SNP *rs2234693* corte *PvuII* en la población Mexicana, el genotipo menos frecuente es el *CC* (8%). Asimismo, se observa en el banco de datos del Hap Map, que para el SNP *rs2234693*, el genotipo *GG* está presente en la población Mexicana en un 3%, el genotipo *AA* en un 55% y el genotipo *AG* en un 42%.

Una vez analizadas las frecuencias genotípicas de nuestra población se procedió a asociar los genotipos con la presencia de fracturas por fragilidad, observando que para la región polimórfica *PvuII* no se encontró asociación significativa de la patología con los diferentes modelos analizados (forma codominante, dominante, recesivo o doble dominante) (cuadro 5); sin embargo, al analizar los genotipos de *Xbal* (cuadro 6), podemos observar que hubo significancia estadística para el modelo recesivo *A/A-A/G G/G*, es decir este modelo se relaciono de alguna manera a la patología,

mostrando que los individuos G/G están fungiendo como protector a fracturas, no así los individuos A/A y A/G, sin embargo no fue posible determinar la Razón de Momios ( $IC_{95\%}$ ) ya que la muestra fue muy pequeña y solo se encontró éste genotipo en las mujeres posmenopáusicas controles(6.9%).

Posteriormente se procedió a investigar si estos genotipos estaban involucrados en la disminución de DMO de columna, encontrado que un genotipo la región polimórfica *XbaI* se asoció en forma significancia a variaciones en la DMO. Se pudo observar que las mujeres posmenopáusicas que tienen el genotipo G/G presentaron una mayor DMO en comparación con las que tienen A/A, con una diferencia de aproximadamente 0.2 g/m<sup>2</sup>. Lo anterior está de acuerdo a la literatura, ya que se ha descrito que la región polimórfica *PvuII* no está asociado a variaciones en la DMO y por el contrario la región polimórfica *XbaI* si se asocia a protección de presentar fracturas<sup>102, 103</sup>. Es importante remarcar que en nuestro estudio no se pudo determinar si *XbaI* está asociado a la protección de fracturas, pero si se encontró que aquellas pacientes que tienen el genotipo G/G presentan una mayor DMO.

Recientemente se ha señalado que el análisis de haplotipo<sup>85</sup> tiene un mayor poder discriminante que el análisis alélico convencional, por lo cual se llevó a cabo el análisis de haplotipos del gen *ESR 1* (*PvuII* y *XbaI*), obteniendo así cuatro haplotipos: A-T, G-C, G-T y A-C. En el cuadro 8 se puede observar que el haplotipo más frecuente en nuestra población fue el A-T, sin embargo no presentó una asociación significancia con la presencia de fracturas. Por otra parte, si se observó una asociación significativa del haplotipo G-C, ya que fue más frecuente en las mujeres controles que en los casos (RM= 0.49; I.C. 95%= 0.27-0.87), lo que implica que el 51% de la población que presento el haplotipo G-C fue protegida de fracturas por fragilidad a comparación de las pacientes que presentaron los haplotipos A-T, G-T y A-C.

Otro dato importante fue que el haplotipo A-C se encontró con mayor frecuencia en los casos en comparación de los controles, dando una razón de momios de 3.69 (IC 95%= 1.02- 13.27).

Se demuestra así, que nuestros resultados son concordantes con los de Albagha y cols.,<sup>104,105</sup> ya que estos autores estudiaron un grupo de mujeres escocesas con una edad media de 64 años y determinaron que la DMO en columna lumbar y cuello de fémur era significativamente menor en las pacientes que presentaban el haplotipo A-C (estando la amplitud de la diferencia en torno a 0,5 desviaciones estándar), con probabilidad de presentar fracturas. Es interesante que en ese estudio tampoco se hallaron diferencias significativas en la masa ósea cuando se consideraban por separado ambos loci, aun cuando existe un marcado desequilibrio de unión entre ellas ( $D' = 0.75$ ).

El mecanismo responsable de estas asociaciones es desconocido, algunos autores han sugerido que debido a que frecuentemente los intrones incluyen regiones moduladoras de la síntesis de ARN, que los alelos C representarían secuencias con menor afinidad por ciertos factores de transcripción; sin embargo, no está claramente demostrado que el intrón 1 del *ESR* desempeñe un papel regulador de la transcripción. Más bien, está asociado el haplotipo A-C con menor masa ósea y fracturas, en ausencia de relación con los alelos respectivos considerados aisladamente, apunta la posibilidad de que exista un desequilibrio de unión entre estos haplotipos y otras secuencias polimórficas, en el propio gen del *ESR* o de otros genes próximos, que sean las realmente influyentes en el balance esquelético. De hecho, se ha descrito la existencia de un desequilibrio de unión entre los alelos del intrón 1 aquí analizados y una secuencia polimórfica repetitiva en tándem TA del promotor del gen del *ESR*. Sin embargo, la relación entre los alelos en esta región repetitiva y la masa ósea es también controvertida<sup>104,105</sup>.

## CONCLUSIONES

1. No se encontró asociación en la región polimórfica rs2234693 (corte *PvuII*) del gen *ESR1* y la presencia de fracturas.
2. Encontramos una asociación significativa para el modelo recesivo de la región polimórfica rs9340799 (corte *XbaI*) del gen *ESR1* y la presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano.
3. Asimismo, encontramos que el genotipo G/G de la región polimórfica *XbaI* (rs9340799) está relacionado con un aumento en la densidad mineral ósea, sin embargo no se logro relacionarlo con la protección de fracturas por fragilidad.
4. El análisis de haplotipos de las regiones polimorfismos del intrón 1 de *ESR1* (*PvuII* y *XbaI*) se correlaciona mejor con la presencia y protección a fracturas por fragilidad, de manera que las mujeres con haplotipo A-C presentaron una mayor asociación de fracturas y las que presentaron el haplotipo G-C parecen estar protegidas. No obstante, se necesitan estudios más amplios para confirmar estos resultados.
5. Las características epidemiológicas de nuestra población, muestra que los factores antropométricos (edad, índice de masa corporal, y peso) y hábitos (bajo consumos de calcio y no realizar ejercicio) parecen ser factores fundamentales para el desarrollo de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas.
6. Con base en lo anterior, la presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico Mestizo-Mexicano no es secundaria a una alteración de una región polimórfica del gen *ESR1*, y que la complejidad en la fisiopatología de esta enfermedad podría venir determinada por la acción global de distintos genes que interaccionaran entre sí en conjunto a los factores ambientales.

## REFERENCIAS

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy*. JAMA 2001;285:785-95.
2. National Osteoporosis Society Website. Available at <http://www.nos.org.uk> Accessed 4<sup>th</sup> January, 2007
3. Clark P, Carlos F, Barrera C, Guzman J, Maetzel A, Lavielle P, y cols. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos Int* 2008;19:269-76.
4. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:303-26
5. Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;425:126-34.
6. Albright F, Bloomberg E, Smith PH. Postmenopausal osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians*. 1940;55:298-305.
7. Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ 3rd. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest*. 1982;70:716-23.
8. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005;115:3318-25.
9. Cooper C, O'Neill T, Silman A. The epidemiology of vertebral fractures. *European Vertebral Osteoporosis Study Group*. *Bone*. 1993;14 Suppl 1:S89-97
10. Cauley JA, Hochberg MC, Lui LY, Palermo L, Ensrud KE, Hillier TA, Nevitt MC, Cummings SR. Long-term risk of incident vertebral fractures. *JAMA*. 2007;298:2761-67.
11. Wasnich RD. Vertebral fracture epidemiology. *Bone*. 1996;18:179S-183S.
12. Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporos Int*. 1999;10:214-21.
13. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*. 2002;359:1761-7.
14. Clark P, Lavielle P, Franco-Marina F, Ramírez E, Salmerón J, Kanis JA, Cummings SR. Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population-based study. *Osteoporos Int*. 2005;16:2025-30.
15. Raisz LG, Kream BE, Lorenzo JA. Metabolic bone disease. In: Larsen PR, Kronenger H, Melmed S, Polonsky K, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 2003. p.1373-410.
16. Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, Berger ML, Santora AC, Scherwood LM. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *JAMA*. 2001;286:2815-22
17. Atkinson PJ. Changes in resorption spaces in femoral cortical bone with age. *J Pathol Bacteriol*. 1965;89:173-8.
18. Peacock M, Liu G, Carey M, Ambrosius W, Turner CH, Hui S, Johnston CC Jr. Bone mass and structure at the hip in men and women over the age of 60 years. *Osteoporos Int*. 1998;8:231-9.
19. Bousson V, Meunier A, Bergot C, Vicaut E, Rocha MA, Morais MH, Laval-Jeantet AM, Laredo JD. Distribution of intracortical porosity in human midfemoral cortex by age and gender. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1308-17.
20. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop Relat Res*. 1987;260-71.
21. Aaron JE, Shore PA, Shore RC, Beneton M, Kanis JA. Trabecular architecture in women and men of similar bone mass with and without vertebral fracture: II. Three-dimensional histology. *Bone*. 2000;27:277-82.
22. Riis BJ, Hansen MA, Jensen AM, Overgaard K, Christiansen C. Low bone mass and fast rate of bone loss at menopause: equal risk factors for future fracture: a 15-year follow-up study. *Bone*. 1996;19:9-12.
23. Ralston SH. The genetics of osteoporosis. *QJM*. 1997;90:247-51.
24. Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res*. 2000;15:392-401.

25. Stykarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol.* 2003;1:E69.
26. Kannus P, Palvanen M, Kaprio J, Parkkari J, Koskenvuo M. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of a nationwide cohort of elderly Finnish twins. *BMJ.* 1999;319:1334-7.
27. Harris SS, Patel MS, Cole DE, Dawson-Hughes B. Associations of the collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. *Calcif Tissue Int.* 2000;66:268-71.
28. Salmén T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Saarikoski S, Honkanen R, Mäenpää PH. Early postmenopausal bone loss is associated with PvuII estrogen receptor gene polymorphism in Finnish women: effect of hormone replacement therapy. *J Bone Miner Res.* 2000;15:315-21.
29. Salamone LM, Cauley JA, Zmuda J, Pasagian-Macaulay A, Epstein RS, Ferrell RE, Black DM, Kuller LH. Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J Bone Miner Res.* 2000;15:308
30. Murrillo-Uribe A, Delezé-Hinojosa M, Aguirre E, Villa A, Calva J, Cons F, Briseño A, González G, Morales J, Peña H, Guerrero G, Orozco J, Morales G, Elizondo J. Osteoporosis in Mexican postmenopausal women. Magnitude of the problem. Multicenter study. *Ginecol Obstet Mex.* 1999;67:227-33.
31. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1995;332:767-73.
32. Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 1999;20:788-804.
33. Glüer CC, Cummings SR, Pressman A, Li J, Glüer K, Faulkner KG, Grampp S, Genant HK. Prediction of hip fractures from pelvic radiographs: the study of osteoporotic fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res.* 1994;9:671-67
34. Faulkner KG, Cummings SR, Nevitt MC, Pressman A, Jergas M, Genant HK. Hip axis length and osteoporotic fractures. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res.* 1995;10:506-8.
35. Peacock M, Turner CH, Liu G, Manatunga AK, Timmerman L, Johnston CC Jr. Better discrimination of hip fracture using bone density, geometry and architecture. *Osteoporos Int.* 1995;5:167-73.
36. Karlsson KM, Sernbo I, Obrant KJ, Redlund-Johnell I, Johnell O. Femoral neck geometry and radiographic signs of osteoporosis as predictors of hip fracture. *Bone.* 1996;18:327-30.
37. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R. European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2008a;19:399-428.
38. Bulun SE, Adashi EY. The physiology and pathology of the female reproductive axis. En: *Williams Textbook of Endocrinology*, Larsen PR y cols. (eds). Saunders: Filadelfia. 2003;587-664.
39. Ortiz AP, Harlow SD, Sowers M, Nan B, Romaguera J. Age at natural menopause and factors associated with menopause state among Puerto Rican women aged 40-59 years, living in Puerto Rico. *Menopause.* 2006;13:116-24.
40. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18:58-65.
41. Mitchell ES, Farin FM, Stapleton PL, Tsai JM, Tao EY, Smith-DiJulio K, Woods NF. Association of estrogen-related polymorphisms with age at menarche, age at final menstrual period, and stages of the menopausal transition. *Menopause.* 2008;15:105-11.
42. Bernis C, Reher DS. Environmental contexts of menopause in Spain: comparative results from recent research. *Menopause.* 2007;14:777-87.
43. Mishra G, Hardy R, Kuh D. Are the effects of risk factors for timing of menopause modified by age? Results from a British birth cohort study. *Menopause.* 2007;14:717-24.

44. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002;23:279-302.
45. Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1995;10:466-73.
46. Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, Wark JD. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3366-71.
47. Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ 3rd, Riggs BL. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med.* 1984;311:1273-5.
48. Nilas L, Christiansen C. Bone mass and its relationship to age and the menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:697-702.
49. Wasnich RD. Vertebral fracture epidemiology. *Bone.* 1996;18:179S-183S.
50. Melton LJ 3rd. Epidemiology of spinal osteoporosis. *Spine.* 1997;22:2S-11S.
51. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, De Laet C, Jonsson B. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporos Int.* 2000;11:669-74.
52. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltaev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008b;42:467-75.
53. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int.* 2000;11:556-61.
54. Jalava T, Sarna S, Pylkkänen L, Mawer B, Kanis JA, Selby P, Davies M, Adams J, Francis RM, Robinson J, McCloskey E. Association between vertebral fracture and increased mortality in osteoporotic patients. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1254-60.
55. Kado DM, Duong T, Stone KL, Ensrud KE, Nevitt MC, Greendale GA, Cummings SR. Incident vertebral fractures and mortality in older women: a prospective study. *Osteoporos Int.* 2003;14:589-94.
56. Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporos Int.* 1999;10:214-21.
57. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res.* 2000;15:721-39.
58. Oleksik A, Lips P, Dawson A, Minshall ME, Shen W, Cooper C, Kanis J. Health-related quality of life in postmenopausal women with low BMD with or without prevalent vertebral fractures. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1384-92.
59. Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D. Mortality after admission to hospital with fractured neck of femur: database study. *BMJ.* 2002;325:868-9.
60. Koval KJ, Zuckerman JD. Fracturas del cuello femoral. En: Koval KJ, Zuckerman JD, eds. *Fracturas y Luxaciones. Morban, España, 2003, p.p. 198-199.*
61. Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:573-8.
62. Wu CH, Yang YC, Yao WJ, Lu FH, Wu JS, Chang CJ. Epidemiological evidence of increased bone mineral density in habitual tea drinkers. *Arch Intern Med.* 2002;162:1001-6.
63. Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(4):936-42.
64. Young CM, Weeks BK, Beck BR. Simple, novel physical activity maintains proximal femur bone mineral density, and improves muscle strength and balance in sedentary, postmenopausal Caucasian women. *Osteoporos Int.* 2007;18:1379-87.
65. Koller DL, Econs MJ, Morin PA, Christian JC, Hui SL, Parry P, Curran ME, Rodriguez LA, Conneally PM, Joslyn G, Peacock M, Johnston CC, Foroud T. Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3116-20.

66. Deng HW, Xu FH, Huang QY, Shen H, Deng H, Conway T, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Zhang HT, Davies KM, Recker RR. A whole-genome linkage scan suggests several genomic regions potentially containing quantitative trait loci for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5151-9.
67. Wilson SG, Reed PW, Bansal A, Chiano M, Lindersson M, Langdown M, Prince RL, Thompson D, Thompson E, Bailey M, Kleyn PW, Sambrook P, Shi MM, Spector TD. Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36. *Am J Hum Genet.* 2003;72:144-55.
68. Tasker PN, Macdonald H, Fraser WD, Reid DM, Ralston SH, Albagha OM. Association of PLOD1 polymorphisms with bone mineral density in a population-based study of women from the UK. *Osteoporos Int.* 2006;17:1078-85.
69. McGuigan FE, Larzenius E, Callreus M, Gerdhem P, Luthman H, Akesson K. Variation in the BMP2 gene: bone mineral density and ultrasound in young adult and elderly women. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:254-62.
70. Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcells S, Brandi ML, Scollen S, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reid DM, Armas JB, Arp PP, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Pérez Cano R, Dobnig H, Dunning AM, Fahrleitner-Pammer A, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Masi L, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, Mosekilde L, Nogués X, Pols HA, Reeve J, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Ioannidis JP; APOSS investigators; DOPS investigators; EPOS investigators; EPOLOS investigators; FAMOS investigators; LASA investigators; ERGO investigators; for the GENOMOS Study. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: The GENOMOS study. *Bone.* 2008;42:969-81.
71. Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol.* 2003;177:147-96.
72. Baldock PA, Eisman JA. Genetic determinants of bone mass. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:450-6.
73. Moffett SP, Oakley JI, Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Taylor BC, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G, Cummings SR, Zmuda JM; Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoprotegerin Lys3Asn polymorphism and the risk of fracture in older women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2002-8.
74. Gallagher A, Chambers TJ, Tobias JH. The estrogen antagonist ICI 162,780 reduces cancellous bone volume in female rats. *Endocrinology.* 1993;133:2787-91.
75. Cheng MZ, Rawlinson SC, Pitsillides AA, Zaman G, Mohan S, Baylink DJ, Lanyon LE. Human osteoblasts' proliferative responses to strain and 17beta-estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. *J Bone Miner Res.* 2002;17:593-602.
76. Riggs BL, Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, Melton LJ 3rd. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos Int.* 2003;14:728-33.
77. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, Zaman G, Lee K, Das-Gupta V, Pitsillides AA, Lanyon LE. Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. *J Bone Miner Res.* 2004;19:938-46.
78. Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:688-96.
79. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med.* 1994;331:1056-61.
80. Albrand G, Muñoz F, Sornay-Rendu E. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: The OFELY study. *Bone* 2003; 32: 78-85.
81. Mendoza-Romo MA, Ramírez-Arriola MC. Confiabilidad del cuestionario de Albrand modificado para el diagnóstico de osteoporosis. *Rev Med Inst Mex Segur Soc.* 2007;45:329-34.
82. Carranza-Lira S, Rosas M, Murillo A, Martínez N, Santos J. Osteoporosis in postmenopausal women (Mexico City): **Validation of a predictive clinical index.** *Int J Fertil Womens Med.* 2002;47:26-31.

83. World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series 1994;843. WHO, Geneva.
84. Sen SS, Rives VP, Messina OD, Morales-Torres J, Riera G, Angulo-Solimano JM, Neto JF, Frisoli A Jr, Sáenz RC, Geling O, Ross PD. A risk assessment tool (OsteoRisk) for identifying Latin American women with osteoporosis. *J Gen Intern Med.* 2005;20:245-50.
85. Magaña JJ, Gómez R, Cisneros B, Casa L, Castorena F, Miranda A, Diez P, Castro C, Rubio J, N, Valdés M. Association of the CT gene (CA) polymorphism with BMD in osteoporotic mexican women. *Clin Genet.* 2006;70:402-8.
86. De Lago-Acosta A, Parda tapa MG, Somera Iturbide J. Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México. *Ginecol Obstet Mex.* 2008;76:261-6.
87. John SWM, Weilzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic ADN from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:408
88. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting ADN from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res,* 1988. **16**(3): p. 1215.
89. Wilmington, Delaware. Manual NanoDrop Technologies. ND-1000 Spectrophotometer. USA 2007.
90. Yábar Varas Carlos. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Ed. Trillas, Lima, 2003; p. 33-69
91. Lie SY, Petropoulos JC. Advances in quantative PCR technology: 5. Nuclease assays. *Curr Opin Biotech* 1998;9:43-48.
92. Ruiz-Ponte C, Loidi L, Vega A, Carracedo A, Barros F. Rapid real-time fluorescent PCR gene dosage test for the diagnosis of the ADN duplication and deletions. *Clin Chem* 2000;46:1574-1582.
93. Barrett, J.C., et al., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics,* 2005. 21(2): p. 263-5.
94. Sole, X., et al., SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics,* 2006. 22(15): p. 1928-9.
95. Stephens, M., N.J. Smith, and P. Donnelly, A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet,* 2001. 68(4): p. 978-89.
96. Ribot C, Tremollieres F, Pouilles JM, y cols. Obesity and postmenopausal bone loss: the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. *Bone* 1987; 8: 327-31.
97. Berard A, Bravo G, Gauthier P. Metha- analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 1997; 7: 331- 7.
98. Heaney RP. Thinking straight about calcium. *N Eng J Med* 1992; 328:503-5
99. Caplan GA, Scane AC, Francis RM. Pathogenesis of vertebral crush fractures in women. *J R Soc Med* 1994; 87:200-2.
100. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861. 2007.
101. The International HapMap Consortium. A Haplotype Map of the Human Genome. *Nature* 437, 1299-1320. 2005.
102. Ioannidis JPA, Stavrou I, Trikalinos TA, Zois C, Brandi ML, Gennari L, Albagha O, Ralston SH & Tsatsoulis A 2002 Association of polymorphisms of the estrogen receptor-gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 2048–2060.
103. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG; GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA.* 2004;292:2105-14.
104. Albagha OME, McGuigan FEA, Reid DM, Ralston SH. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 128-34.

- 105.** Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphisms of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 306-311
- 106.** Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first intron are not. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2222-30.
- 107.** Zanchetta José, Talbot Jorge. *Osteoporosis. Fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento.* Editorial Médica Panamericana. Argentina, 2001; 206.

## ANEXO 1



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUJERES POSMENOPÁUSICAS

México, D.F., a \_\_\_\_\_

Por medio de la presente yo, \_\_\_\_\_ autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado "Análisis de polimorfismos del gen del receptor de estrógenos como marcadores de riesgo genético para la presentación de fracturas osteoporóticas en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-mexicano"

El objetivo de este estudio es conocer mediante un estudio realizado en un laboratorio acerca de diversos genes los cuales tienen el material de la herencia, las alteraciones que pudieran condicionar la presencia de osteoporosis.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: completar un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar osteoporosis (como dieta, ingesta de alimentos, medicamento, etc.), la toma de una muestra única de 5mL de sangre, así como la realización del estudio que me permitirá saber si tengo o no osteoporosis por medio de un estudio donde medirán mi densitometría ósea con radiografías (estudio llamado DEXA).

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

- a) Por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematomas o morete en el sitio del piquete de la vena.
- b) Por la extracción de la sangre: ninguno.
- c) Por la prueba de medición de densitometría ósea (con el método de DEXA): este al ser un procedimiento simple, rápido y no invasivo, no requiere preparación especial y se considera que no tiene efectos secundarios y sus riesgos son considerados mínimos.

Beneficios:

- a) Las mujeres posmenopáusicas que accedan a participar en el estudio se les llevará a cabo el estudio de la densitometría ósea (método DEXA), la cual no se les practica rutinariamente.
- b) El examen de densidad ósea o DEXA es el método disponible más preciso para el diagnóstico de la osteoporosis, enfermedad que frecuentemente afecta a las mujeres después de la menopausia y también permite estimar el riesgo de fracturas en los pacientes, contribuyendo a seleccionar los casos que deben recibir tratamiento médico y de esa forma evitar posibles fracturas.

- c) Además se generará información para determinar la asociación entre polimorfismos en genes y el desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, lo que permitirá hacer prevención y dar tratamiento oportuno.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto. Asimismo, se me ha informado que en el caso de que mi muestra sea tomada en el Hospital de Traumatología Victoriano de la Fuente Narváez, UMAE Magdalena de las Salinas del IMSS, o alguna otra unidad médica del IMSS será enviada al Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, en donde será almacenada para su análisis genético posterior. Finalmente, esta muestra además será almacenada a – 20°C durante un período de 15 a 20 años en la Unidad de Investigación en Biología del Desarrollo, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F. y a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con su tratamiento.

Asimismo, se ha informado que de encontrarme osteoporosis, se me ha asegurado que se me informará de la presencia de dicha enfermedad, así como que se me dará seguimiento y tratamiento adecuado en la clínica del IMSS o ISSSTE que me corresponda.

El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir lo anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (no empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, Unidad de Investigación en Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, 2do. Piso del edificio D en la subdirección de enseñanza e investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100. Teléfono: 52005003 ext.14603 o 14624. Correo electrónico: [ipcanto@yahoo.com.mx](mailto:ipcanto@yahoo.com.mx).

---

Investigador Responsable  
Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

---

Señora

---

Testigo

---

Testigo

## ANEXO 2



### Cuestionario de Factores de Riesgo para Osteoporosis.



Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ años Lugar de Residencia \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_ años

Estatura: \_\_\_\_\_ m Peso: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

LUGAR DE NACIMIENTO DE:

Paciente	
Padre	
Madre	
Abuelos Paternos	
Abuelos Maternos	

Antecedentes Familiares de:

Osteoporosis (disminución de estatura, fractura de cadera), diabetes, enfermedad tiroidea, litiasis renal, cáncer de mama.

¿Cuál?	¿Quién?
¿Cuál?	¿Quién?

Antecedentes personales no patológicos

	Sí	No	Cantidad	Frecuencia	Duración	Actual sí	Actual No
Alcoholismo							
Tabaquismo							
Café							
Refresco de cola							
Refresco mineral							
Vegetariano							
Vaso de leche/ día (o yougurth)							
Queso (porción de 30g)							
Tortilla							
Suplementos de calcio							
Ejercicio regular							

**Antecedentes personales patológicos.**

Artritis reumatoide, desnutrición, intolerancia a la leche, Sx de mala absorción intestinal, gastrectomía, hepatopatía crónica, EPOC, mieloma, insuficiencia renal, amiloidosis, epilepsia, cardiopatías, cáncer de \_\_\_\_\_, osteoporosis, insuficiencia venosa, tromboflebitis, litiasis renoureteral.

DX	Año DX	Actual	Sí	No
DX	Año DX	Actual	Sí	No

Fracturas SI (NO) ¿Cuántas? \_\_\_\_\_ localización \_\_\_\_\_

A qué edad \_\_\_\_\_

**Antecedentes ginecobstétricos**

Menarquía: _____ años	Ciclos regulares <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Duración: _____	Gesta: _____
Partos: _____	Abortos: _____	Cesáreas: _____	Lactancia en meses: _____
Menopausia <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Edad: _____ años	Histerectomía: _____	Ooforectomía <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Edad: _____ años	Tx de reemplazo hormonal: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Tipo de Tx hormonal: _____	Tiempo del tratamiento hormonal: _____

Utiliza o utilizo tratamiento sustitutivo con estrógenos: (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿desde cuándo? \_\_\_\_\_

¿Qué tipo de estrógenos? \_\_\_\_\_ Dosis \_\_\_\_\_

Comentarios \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Aplico: Nombre \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_