

**“POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE *OPG* Y *ESR1* COMO
MARCADORES DE RIESGO GENÉTICO PARA LA PRESENTACIÓN DE
FRACTURAS OSTEOPORÓSTICAS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS”**

ALUMNO:

DRA. CASTAÑEDA PEREZ NAYELI

Estudiante de Maestría en Ciencias Médicas.

TUTORES:

DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

Jefe de División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

M. en C. DAVID ROJANO MEJÍA

Adscripción: Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, Región Centro, UMAE Lomas Verdes, IMSS.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber recibido una beca durante la realización de mis estudios de Maestría; así como a la Secretaría de Salud (SS).

Este trabajo pudo ser llevado a cabo por el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), apoyo 2009-113574.

RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad común caracterizada por una disminución en la DMO, deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, así como un incremento en el riesgo de presentar fracturas por fragilidad. Tanto los factores ambientales como los factores genéticos muestran un papel importante en la presencia de fracturas. El objetivo de este estudio es analizar si los polimorfismos rs2073618 (K3N) de *OPG* y rs3020314 (c.1096+5029C>T) en *ESR1* se asocian a un mayor riesgo de presentar fractura. **Material y métodos:** Se trata de un estudio observacional, analítico de casos y controles. Los casos (191) son pacientes con fracturas por fragilidad y los controles 1 pacientes con DMO (densidad mineral ósea) normal y los controles 2 pacientes con osteoporosis. A todas las pacientes se les realizó una densitometría ósea. Se les aplicó un cuestionario en donde se recabará información de la presencia de factores de riesgo y se procedió a la toma de una muestra de sangre periférica. **Resultados:** Al comparar los casos contra los controles 1, se observó que el genotipo rs2073618 de *OPG* presentó RM =1.607, I.C.) al 95%= 0.641 – 2.630; $p = 0.58$. Por otra parte, al comparar los casos contra los controles 2 el genotipo rs2073618 presentó una RM=1.426; I.C. al 95%= 0.930 – 2.188; $p= 0.103$); con respecto al genotipo rs3020314 del gen *ESR1* al comparar los casos contra los controles 1, se observó una asociación significativa de dicho SNP con la presencia de fracturas osteoporóticas (RM= 2.288, con un I.C. al 95%= 1.396 – 3.747; $P= 0.00091$). De igual forma, también se observó una asociación significativa con la presencia de fracturas osteoporóticas al comparar los casos contra los controles 2 (osteoporosis), presentando una RM= 2.021, con un I.C. al 95%= 1.315 – 3.108; $P = 0.00325$. Por otro lado, al ajustar el modelo por posibles variables confusoras y correr el mejor modelo el polimorfismo rs2073618 del gen *OPG* se pudo observar que también se asocia a la presencia de fracturas al igual que el polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1* de manera significativa. **Conclusión:** El presentar al menos un polimorfismo (rs2073618 del gen *OPG* o el polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1*), se asocia a la presencia de fracturas por fragilidad en nuestra población de estudio. De tal forma, que pudiera ser considerado ambos polimorfismos como posibles marcadores genético para presencia de fracturas en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

ANTECEDENTES

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 (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Peacock y cols., 2002; Lin y Lane, 2004). Este síndrome probablemente ha existido a lo largo de la historia de la humanidad, pero solo en años recientes se ha catalogado como un gran problema de salud debido al incremento en la expectativa de vida. Al comienzo del siglo 19, el cirujano inglés Sir Astley Cooper, describió “que la porosidad y la disminución de la fuerza de los huesos se adquieren en los estado más avanzados de la vida” y que “este estado del hueso....favorece el aumento de fracturas” (Cooper y Cooper, 1822). Poco tiempo después, Johann Lobstein, acuñó el término de osteoporosis, sin embargo la patología que describió encaja con el diagnóstico de osteogénesis imperfecta (Schapira y Schapira, 1992). En 1940, Fuller 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 (Albright y cols., 1940). 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 (Riggs y cols., 1982). Actualmente, se considera que la osteoporosis representa un continuo, en el cual múltiples mecanismos patogénicos convergen para causar la pérdida de la masa ósea (Raisz, 2005).

Epidemiología

La prevalencia de osteoporosis y la incidencia de fracturas por la misma, varían de acuerdo con la edad, sexo y el grupo étnico (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Peacock y cols., 2002). 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 (Clark y cols., 2005) y la prevalencia estimada de fracturas por osteoporosis es del 35% al 50% en mujeres mayores de 50 años (Cooper y cols., 1993; Wasnich, 1996; Melton, 1997; Cauley y cols., 2007). En los Estados Unidos de Norteamérica, se reportan al año, alrededor de 700,000 casos por este tipo de fracturas y sólo un tercio de ellas son diagnosticadas clínicamente (Cooper y cols., 1993; Cauley y cols., 2007). 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 (Cummings y Melton, 2002), lo cual representa alrededor del 15% de las mujeres de 50 años o más. Murrillo-Urbe y cols. (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. En otro estudio poblacional llevado a cabo por Clark y cols., (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. (Clark y cols., 2005).

La probabilidad de una mujer caucásica a los 50 años de que tenga una fractura en el resto de su vida por osteoporosis es del 40% y en el varón caucásico es entre el 13 y 20% (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Raisz y cols., 2003; Cauley y cols., 2007; Spencer, 2007; Sharma y cols., 2008).

Este síndrome ha sido considerado como una patología propia de las mujeres posmenopáusicas de descendencia Europea (especialmente del norte), debido a la alta incidencia de fracturas que presentan dichas mujeres (Johnell y cols., 1992; Kannus y cols., 2000); sin embargo, la frecuencia de fracturas osteoporóticas es también muy alta en otras poblaciones y ésta se ha incrementado debido al aumento de la expectativa de vida. De igual forma, la incidencia de fractura de cadera ajustada por edad alrededor del mundo, está en aumento, posiblemente debido a un incremento en la industrialización y a una disminución de la actividad física. Asociado a lo anterior, la variación en la incidencia de fracturas osteoporóticas entre las poblaciones, puede ser secundaria a las modificaciones en la arquitectura ósea, así como a su recambio o a su masa (Johnell y cols., 1992; Kannus y cols., 2000).

Clasificación:

La osteoporosis puede dividirse en primaria y secundaria (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Raisz et al., 2003), 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 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 (Atkinson, 1965; Peacock y cols., 1998) e incremento de la porosidad intracortical (Atkinson, 1965; Bousson y cols., 2001); por otra parte, el efecto en el hueso trabecular, se traduce como un adelgazamiento trabecular (Atkinson, 1967; Aaron y cols., 1987), así como en pérdida de la conexión del mismo (Aaron y cols., 2000).

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 (Riis y cols., 1996).

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 (Ralston, 1997; Nguyen y cols., 2000; Stykarsdottir et al., 2003); pero, dichos factores probablemente juegan un papel menos importante en determinar la incidencia de fracturas en personas de edades avanzadas (Kannus y cols., 1999). 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 (Harris y cols., 2000; Salmén y cols., 2000; Salamone y cols., 2000); 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, 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 (Cummings y cols., 1995; Riis y cols., 1996). 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 (Raisz et al., 2003).

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; por lo 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 (Raisz et al., 2003).

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 (Eisman, 1999),

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 (Gluer y cols; 1994; Faulkner y cols., 1995; Peacock y cols., 1995; Karlsson y cols., 1996; Kanis y cols., 2008a).

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 (Bulun y Adashi, 2003). 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 (Bulun y Adashi, 2003; Ortiz et al., 2006; Broekmans y cols., 2007; Mitchell et al., 2008); sin embargo, numerosos factores ambientales pueden modificar la edad de la misma (Bernis y Reher, 2007; Mishra y cols., 2007).

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 posmenopausia, son insuficientes para dar apoyo al tejido óseo (Riggs y cols., 2002). 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 (Riggs y cols., 2002). 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 (Parfitt y cols. 1995; Ebeling y cols., 1996).

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 (Richelson y cols., 1984; Nilas y Christiansen, 1987). 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 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 (Richelson y cols., 1984; Nilas y Christiansen, 1987).

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 (Cooper y cols., 1993; Wasnich, 1996; Melton, 1997; Cauley y cols., 2007; Kanis y cols., 2008a). 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% (Kanis y cols., 2000; Kanis y cols., 2008a). Las mujeres posmenopáusicas con fracturas por osteoporosis, además de presentar una disminución en su sobrevida (Cauley y cols., 2000; Jalava

y cols., 2003; Kado y cols., 2003), presentan un riesgo aumentado de sufrir futuras fracturas vertebrales, así como de cadera y otras fracturas no espinales (Melton y cols., 1999; Klotzbuecher y cols., 2000). 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 (Nevitt y cols., 1998; Oleksik y cols., 2000).

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 las fractura, requerirán cuidados especiales en su domicilio (Goldacre y col., 2002)

La DMO 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 (Koval y Zuckerman, 2003).

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 (Peacock y cols., 2002).

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 menarca tardía y menopausia temprana (Peacock y cols., 2002; Riggs y cols., 2002). Por otra parte, los estudios de asociación de bebidas alcohólicas o con cafeína y disminución en la DMO, han dado resultados inconsistentes (Harris y Dawson-Hughes, 1994; Wu y cols., 2002; Tucker y cols., 2006). Por el contrario, la actividad y la función física se han asociado con un aumento en la DMO (Young y cols., 2007; Wilund y cols., 2008). Asimismo, existen diversos factores de riesgo genéticos que se han asociado al desarrollo de osteoporosis, los cuales se explicarán con detalle más adelante (Peacock y cols., 2002).

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 (Koller y cols., 2000; Deng y cols., 2002; Wilson y cols., 2003; Tasker y cols., 2006; McGuigan y cols., 2007; Langdahl y cols., 2008). 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 (Liu y cols., 2003; Baldock y Eisman, 2004). 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 (Ioannidis y cols., 2004).

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 (Cummings y cols., 1995, Moffett y cols., 2008).

Polimorfismo en el gen de la *Osteoprotegerina (OPG o TNFRSF11B)*

El receptor activador del ligando del factor nuclear κ B (RANKL) (Manolagas, 2000), el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK) (Lacey y cols., 1998) y la osteoprotegerina (OPG) (Simonet y cols., 1997) (los cuales pertenecen a TNF, así como a la superfamilia de receptores TNF), representan un sistema novel de citocinas involucrados en la formación, fusión, supervivencia, activación y apoptosis de los osteoclastos. RANKL activa la diferenciación de los osteoclastos, incrementa la actividad de los osteoclastos maduros e inhibe la apoptosis de los mismos, a través de su unión a su receptor funcional RANK. OPG es un receptor señuelo para RANKL, que puede prevenir la interacción entre RANKL y RANK, lo cual inhibe los estadios terminales de la osteoclastogénesis, suprime la actividad de los osteoclastos maduros e induce apoptosis de los mismos. Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que OPG es importante para la regulación del remodelamiento óseo. Los estudios llevados a cabo en ratones transgénicos, en los cuales se sobreexpresa *Opg*, demostraron que los ratones desarrollan osteopetrosis

(Simonet y cols., 1997), mientras que los ratones nulos para *Opg*, desarrollan en forma temprana, osteoporosis severa (Bucay y cols., 1998; Mizuno y cols., 1998). Asimismo, la administración exógena de OPG en ratones ovariectomizados, puede prevenir la pérdida ósea secundaria a dicho procedimiento (Simonet y cols., 1997). Con base en lo anterior, se ha postulado que *OPG* es un atractivo candidato involucrado en el desarrollo de la osteoporosis.

El gen de la *OPG* en el humano se localiza en 8q24 y codifica para una proteína de 401 aminoácidos, que pertenece a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral 11b (TNF) (OMIM: #602643).

El polimorfismo no sinónimo K3N (rs2073618) que además de asociado a la presencia de fracturas se encuentra involucrado en las variaciones en la DMO de las vértebras lumbares (L₂₋₄) (Langdahl y cols., 2002; Ohmori y cols., 2002; Sattler y cols., 2004; Zhao y cols., 2005); sin embargo, otros estudios no han demostrado dicha asociación (Wynne y cols., 2002, Brändström y cols., 2004). El genotipo Asn-Asn (del polimorfismo K3N) se asocia en forma independiente de la edad y del índice de masa corporal de las mujeres posmenopáusicas a una DMO de las vértebras lumbares más alto. Asimismo, Langdahl y cols. (2002), describieron que la presencia del genotipo CC (Asn) era menos común en las mujeres posmenopáusicas con fractura de vértebras que en las mujeres controles. Por el contrario aquellas mujeres portadoras del alelo-Lis, presentaron un riesgo más alto de desarrollar osteopenia/osteoporosis (Arko y cols., 2005, Zhao y cols., 2005; Kim y cols., 2007; García Unzueta y cols., 2008). Recientemente Moffett y cols. (2008), describieron que ser portadoras del alelo Lis, aumenta el riesgo de presentar fractura en la cadera.

Polimorfismo en el gen del *Receptor de Estrógenos α* (*ESR1* o *ESR-α*)

En las mujeres posmenopáusicas la deficiencia de estrógenos es una de las causas principales para el desarrollo de osteoporosis (Riggs y cols., 2002). 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 (Gallagher y cols., 1993, Cheng y cols., 2002; Riggs y cols., 2002; Riggs y cols., 2003; Jessop y cols., 2004; Syed y Khosla, 2005). 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 (Smith y cols., 1994).

El gen del *ESR1* o *ESR-α* en el humano se localiza en 6q25.1 y codifica para una proteína de 595 aminoácidos (OMIM: +133430).

Recientemente Wang y cols., (2008) llevaron a cabo un estudio de asociación de dos nuevos SNPs (rs3020314 [NM_000125.2:c.1096+5029C>T] y rs1884051 [NM_000125.2:c.1096+17636G>A]) en *ESR1* y presencia de fracturas de cadera en sujetos con osteoporosis de origen étnico Chino; observando un riesgo aumentado de presentar fractura para el SNP rs3020314 de una RM de 1.66, con un IC al 95% de 1.25 a 2.18, $P= 0.0004$.

Características clínicas de la osteoporosis

Las manifestaciones más comunes de la osteoporosis, son las fracturas por compresión de las vértebras (de una sola o de múltiples de éstas) que pueden presentarse en forma espontánea o por un traumatismo leve. El cuadro clínico es

variable y puede ser asintomático o por lo general presentar dolor agudo de espalda con pérdida de la función que se corrobora al examen físico; asimismo, se puede observar una disminución en la talla (altura), así como deformación de las curvaturas de la columna. Las fracturas vertebrales frecuentemente son recurrentes lo que puede llevar a una desestabilización de la columna vertebral.

Otro sitio frecuente de fractura es la cadera, que se manifiesta con dolor agudo así como pérdida de la función, la recuperación es lenta y la rehabilitación frecuentemente es incompleta. Es la manifestación más grave de la osteoporosis y la principal causa de incapacidad y muerte entre las mujeres en edad avanzada con esta patología (Moffett y cols., 2008). Le siguen en frecuencia la fractura en la parte distal del antebrazo que también se manifiesta por dolor agudo y pérdida de la función, pero la recuperación funcional usualmente es buena o excelente (Kanis y cols., 2008a) y finalmente, otros sitios comunes de fracturas son: el extremo proximal del fémur y el extremo distal del radio (fractura tipo Colles) (Raisz y cols., 2003).

Diagnóstico de osteoporosis

El objetivo de medir la DMO es el de dar un criterio diagnóstico, información de un nivel basal y de la probabilidad de sufrir futuras fracturas, el cual sirve de referencia para monitorear la historia natural de los pacientes con o sin tratamiento (Kanis y cols., 2008a).

La DMO baja, es el principal factor de riesgo para desarrollar fracturas por fragilidad, por lo que la Organización Mundial de la Salud junto con la Fundación Internacional de Osteoporosis (Consensus Development Conference, 1993; World Health Organisation, 1994; NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Siris y cols., 2001; Kanis y cols., 2008;

Kanis y cols., 2008a), han propuesto cuatro categorías para evaluar la DMO utilizando el método de absorciometría por rayos X de energía dual (DEXA) (se describirán con detalle en la sección de Sujetos y Métodos).

Diagnóstico de fracturas

El diagnóstico de fractura de vértebras se lleva a cabo con radiografías laterales de las vértebras torácicas y lumbares y para el diagnóstico de fractura de cadera y muñeca se lleva a cabo con valoración de radiografías en posición anteroposterior y laterales, de acuerdo con los lineamientos internacionales (Kiel, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los resultados contradictorios de los estudios de asociación de los diferentes polimorfismos descritos 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 las siguientes preguntas de investigación:

¿Los polimorfismos rs2073618 (K3N) de *OPG* y rs3020314 (c.1096+5029C>T) en *ESR1* se encuentran asociados con la presencia de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano?

JUSTIFICACIÓN

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 (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Peacock y cols., 2002). 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 (Siris y cols., 2001) y en el Reino Unido de alrededor de 1.7 billones de libras/año (Nacional Osteoporosis Society Website, 2007). 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 (Clark y cols., 2005, 2008). 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.

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 (Peacock y cols., 2002). 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 en el marco teórico 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.

Nos encontramos frente a una etapa en la cual la genética se ha vuelto plenamente aplicable tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de enfermedades etiológicamente complejas, pero a la vez tan comunes como es el desarrollo de fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas. Este es un proyecto en el que participaran diversos centros de referencia a nivel Nacional: el hospital Regional Tacuba y el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, el Hospital General de México OD, S.S. y el Hospital de Traumatología Victoriano de La Fuente Narváez, UMAE Magdalena de las Salinas, del IMSS. Todos los centros anteriores se encuentran a la vanguardia de la atención médica en nuestro país y dado que son centros de referencia Nacional de la población mexicana, es prioritario llevar a cabo este estudio, para establecer si estos polimorfismo presentan la misma asociación de protección o de factores de riesgo y de esta forma en un futuro poder ofrecerles una posible prueba de marcadores genéticos asociados con el desarrollo de fracturas por fragilidad en estas mujeres. Este proyecto corresponde al área de enfermedades crónicas (osteoporosis), las cuales son consideradas como áreas prioritarias en la investigación nacional e institucional.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar si los polimorfismos rs2073618 (K3N) de *OPG* y rs3020314 (c.1096+5029C>T) en *ESR1* se asocian a un mayor riesgo de presentar fractura(s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

Objetivos específicos:

1. Analizar si el polimorfismo rs2073618 (K3N) de *OPG* se asocia con la presencia de fractura (s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.
2. Analizar si el polimorfismo rs3020314 (c.1096+5029C>T) en *ESR1*, se asocia con la presencia de fractura (s) por fragilidad en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.
3. Analizar la posible asociación de los haplotipos y de los diferentes genes con presencia de fracturas por fragilidad, en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

HIPÓTESIS GENERAL

Las mujeres posmenopáusicas que presentan fracturas por fragilidad de origen étnico mestizo-Mexicano, presentan polimorfismos genéticos que predisponen al desarrollo de dicha patología.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trata de un estudio observacional, analítico de casos y controles.

SUJETOS

Se incluyeron a mujeres posmenopáusicas (mujeres con ausencia de menstruación de más de 12 meses), sin osteoporosis (controles 1) con osteoporosis (controles 2) sin fractura, 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 encuentren relacionadas biológicamente entre sí).

Para este estudio, las mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis (controles 1) con osteoporosis (controles 2) sin fractura fueron reclutadas en el Hospital Regional Tacuba así como del C.M.N. 20 de Noviembre del ISSSTE y las mujeres posmenopáusicas con fracturas por fragilidad se reclutaron en el Hospital General de México OD, S.S. y del Hospital de Traumatología Victoriano de La Fuente Narváez, del IMSS.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

CASOS

Criterios de inclusión de mujeres posmenopáusicas con fracturas por osteoporosis:

1. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.
2. Que se demuestre con el estudio de 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.

CONTROLES 1.

Criterios de inclusión de mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis:

1. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.
2. Que se demuestre con el estudio de DEXA presencia de normalidad en DMO (ver apartado de diagnóstico).
3. Que sean de origen étnico mestizo-Mexicano.
4. Cese de menstruación de más de 12 meses.

CONTROLES 2.

Criterios de inclusión de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis sin fractura:

1. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.
2. Que se demuestre con el estudio de DEXA presencia de osteoporosis DMO (ver apartado de diagnóstico).
3. Que sean de origen étnico mestizo-Mexicano.
4. Cese de menstruación de más de 12 meses.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN CASOS Y CONTROLES 1 Y 2.

Criterios de exclusión de mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis:

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. Enfermedad de Paget's ósea, osteomalacia, osteogénesis imperfecta.
4. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades que afecten el metabolismo óseo (relacionadas con alteraciones de la hormona paratiroides, diabetes mellitas, enfermedades hepáticas, falla renal y displasias óseas).
5. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo de la vitamina D.
6. Ooforectomía bilateral antes de los 45 años de edad.
7. Insuficiencia ovárica prematura.
8. Hipogonadismo hipogonadotrópico.

MUESTRA

Tipo.

No probabilístico de casos consecutivos

Cálculo del tamaño de la muestra.

Controles 1: mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis.

Se buscó una diferencia en las frecuencias genotípicas de los alelos de los genes de interés (*OPG* y *ESR1*) bajo el supuesto de la menor diferencia utilizando como referencia la fórmula de cálculo de tamaño de muestra de dos proporciones; tomando en cuenta la probabilidad de exposición de los controles es de 0.17 y la

probabilidad de exposición de los casos es de 0.333. Se consideró un valor de significancia (α) de 0.05 para 2 colas de distribución, un poder de 0.80 y la selección de 1 control por cada caso.

Con estos datos para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la expresión:

$$n = \frac{\left[z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

En dónde:

n = tamaño de la muestra.

$Z\alpha = 1.96$ que equivale a una probabilidad de error tipo alfa de 5%

$p = \frac{1}{2} (p_1 + p_0)$ $q = 1-p$

$Z\beta = 0.84$ que equivale a una probabilidad de error beta de 20%

p_1 = Probabilidad de exposición de los casos

p_2 = Probabilidad de exposición de los controles

n = 110 en ambos grupos (casos y controles) con la siguiente distribución.

Población	Número de casos Fx Fragilidad	Número de controles Sin Osteoporosis
Mestiza-Mexicana	110	110
Total	110	110

Controles 2: mujeres posmenopáusicas con osteoporosis.

Se buscó una diferencia en las frecuencias genotípicas de los alelos de los genes de interés (*OPG*, *ESR1*) bajo el supuesto de la menor diferencia utilizando como referencia el estudio de Wang y cols., (2008) en el cual se encontró una asociación entre el polimorfismo rs3020314 de *ESR1* y la presencia de fracturas de cadera en mujeres posmenopáusicas, el cual presentó una razón de momios de 1.66.

Se consideró un valor de significancia (α) de 0.05 para 2 colas de distribución, un poder de 0.80 y la selección de 1 control por cada caso. La probabilidad de exposición de los controles es de 0.333.

$$n = \frac{[Z\alpha\sqrt{2\hat{p}\hat{q}} + Z\beta\sqrt{p_1q_1 + p_0q_0}]^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

En dónde:

n = tamaño de la muestra.

$Z\alpha = 1.96$ que equivale a una probabilidad de error tipo alfa de 5%

$p = \frac{1}{2}(p_1 + p_0)$ $q = 1 - p$

$Z\beta = 0.84$ que equivale a una probabilidad de error beta de 20%

$p_1 = p_0 R \div [1 + p_0 (R-1)]$ $q_1 = 1 - p_1$

p_0 = Frecuencia relativa esperada (o proporción esperada) de la exposición de interés en los controles (0.333)

$q_0 = 1 - p_0$

R = Razón de momios esperada de la asociación.

$n = 191$ con la siguiente distribución

Población	Número de casos Fx Fragilidad	Número de controles Con osteoporosis
Mestiza-Mexicana	191	191
Total	191	191

En ambos casos se realizó el cálculo de tamaño de muestra con el programa Power and Sample Size Calculations versión 3.0.5.

Distribución final:

Población	Número de casos Fx Fragilidad	Número de controles 1 sin osteoporosis	Número de controles 2 con osteoporosis
Mestiza- Mexicana	191	110	191
Total	191	110	191

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los casos y los controles fueron pareados de acuerdo al tiempo de exposición a los estrógenos medido en años (menopausia – menarca) (hasta con 2 años de diferencia más, menos).

Se llevó a cabo en el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Análisis univariado:

Estadística descriptiva:

Para las variables cuantitativas se obtuvieron media y desviación estándar, para las variables categóricas se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas.

Análisis bivariado:

Análisis de asociación entre la presencia de los polimorfismos y fracturas osteoporóticas con prueba ji-cuadrada y cálculo de riesgo mediante razón de momios.

Para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de las frecuencias genotípicas se utilizó la prueba de chi cuadrada.

Ambas pruebas se realizaron con el programa haploview versión 4.2.

Análisis multivariado:

Se utilizó un modelo estadístico de regresión logística para identificar los predictores de osteoporosis y fractura por fragilidad, ajustado por posibles factores confusores.

VARIABLES

VARIABLE	NIVEL METODOLOGICO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE DATO	ESCALA DE MEDICIÓN
Fx por Fragilidad	Dependiente	Perdida de la solución de continuidad, parcial o total de un hueso en mujeres con osteoporosis producida por un mecanismo de bajo impacto	Fx de cadera o muñeca por Rx o columna con <3mm en cualquiera de los diámetros del cuerpo vertebral en hueso osteoporótico < 2.5 ds originado por un mecanismo de bajo impacto.	Nominal Presencia Ausencia	Nominal
Polimorfismo	Independiente	Son los múltiples <u>alelos</u> de un <u>gen</u> entre una población.	Polimorfismo OPG, ESR1 y LRP5	Nominal Presente Ausente	Nominal
Menarca	Confusora	Primer sangrado menstrual	Edad en años del primer sangrado menstrual.	Cuantitativa años	De Razón
Menopausia	Confusora	12 meses posteriores al cese de la menstruación	Edad en años 12 meses posteriores al cese de la menstruación.	Cuantitativa años	De Razón
Índice de masa corporal	Confusora	Medida de asociación entre el <u>peso</u> y la <u>talla</u> de un individuo. Se calcula según la expresión matemática: $IMC = \frac{\text{peso}(kg)}{\text{talla}^2(m^2)}$	Normal IMC ≥ 20 -<25 Sobrepeso IMC ≥ 25 Obesidad IMC ≥ 30	Ordinal Kg/m ²	Ordinal
Ejercicio	Confusora	Esfuerzo corporal que se hace para mantenerse saludable y en forma.	Esfuerzo corporal con un objetivo específico por un tiempo mayor o igual a 45 min	Cuantitativa Sesiones a la semana	De Razón
Antecedente De Fx	Confusora	Antecedente de pérdida de la solución de continuidad, parcial o total de un hueso	Antecedente de fractura en algún momento de la vida.	Nominal Si No	Nominal
Lactancia	Confusora	Alimentación con leche materna	Suma de meses de alimentación con leche materna en cada hijo.	Cuantitativa meses	De Razón
Alcoholismo	Confusora	Consumo de alcohol	Ingestión diaria de alcohol superior a 50 gramos	Nominal Si No	Nominal
Tabaquismo	Confusora	Consumo de cigarros	Número de cigarrillos al día	Cuantitativa # cigarrillos	De razón
Dieta	Confusora	Consumo habitual de alimentos	Consumo de café, leche, queso, tortillas por día	Cuantitativa Tazas Vasos Número Porciones	De razón

PROCEDIMIENTO

A todas las mujeres posmenopáusicas se les realizó una densitometría ósea de dos regiones por el método de 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 ingresen a este estudio, se realizará por un técnico certificado por “The International Society for Clinical Densitometry” específicamente por “Clinical Densitometrist”, asimismo el equipo se encuentra certificado y de acuerdo con los controles de calidad requeridos.

Se les aplicó un cuestionario en donde se recabará información de la presencia de factores de riesgo (anexo 1), que incluye al cuestionario de Albrand modificado (Mendoza-Romo y cols., 2007), así como los datos del índice clínico predictivo validado (Carranza-Lira y cols., 2002) y la firma de la carta de consentimiento (anexo 2). Se procedió a la toma única de una muestra de 5 ml de sangre de una vena periférica, para la posterior extracción del ADN de los leucocitos de sangre periférica.

El diagnóstico de osteoporosis se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la OMS (World Health Organisation, 1994), Carranza-Lira y cols. (2002), Sen y cols. (2005), y Magaña y cols. (2006), de Lago Acosta y cols. (2008) para mujeres Latinoamericanas.

El diagnóstico se basa cuatro categorías para evaluar la DMO utilizando el método de absorciometría por rayos X de energía dual (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 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 (World Health Organisation, 1994; NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Sen y cols., 2005; Magaña y cols., 2006).

Con el método actual de la DEXA frecuentemente se evalúan 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 (World Health Organisation, 1994; Kanis y cols., 1998). 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 (Kanis y cols., 2005; Kanis y cols., 2008b).

Por otra parte se incluirán para este proyecto mujeres posmenopáusicas con fractura por osteoporosis sólo en vértebras, muñeca y en cadera (trans e inter-trocánter); asimismo, se llevará a cabo el análisis estratificado por región anatómica, con el fin de establecer si una fractura específica se asocia a un polimorfismo determinado. El diagnóstico de fractura de vértebras se llevó a cabo con radiografías laterales de las

vértebras torácicas y lumbares, de acuerdo con los lineamientos internacionales. Se valoró la morfometría de las vértebras de acuerdo al cálculo de la altura anterior (H_a), media (H_m) y posterior (H_p) de cada cuerpo vertebral (T_4 a L_4) (Kiel, 1995). Por lo que una fractura vertebral se define como una disminución de al menos 4mm de longitud en cualquiera de las tres mediciones de altura del cuerpo vertebral (H_a , H_m o H_p) (Black y cols., 1999).

El diagnóstico de fractura de cadera y muñeca se llevó cabo con valoración de radiografías en posición antero-posterior y laterales.

Extracción de ADN de sangre periférica

Se procedió a la toma única de una muestra de 5 ml de sangre de una vena periférica, para la posterior extracción del ADN de los leucocitos de sangre periférica. La técnica para la extracción del mismo se base en la descrita por John y cols. (1991) con algunas modificaciones: brevemente, la sangre se depositó en tubos de 5 ml que contenían etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5M, pH 8, como anticoagulante. Las muestras fueron colocadas en hielo agregándosele sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, $MgCl_2$ 0.01M y Tritón 100X al 2%) y agua desionizada (ddH_2O). Los leucocitos se separaron por centrifugación y se decantó el sobrenadante hasta que se obtuvo un botón nuclear. Para lisar los leucocitos se añadió amortiguador de lisis nuclear, pH 8.2, (Trizma-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na_2EDTA 2mM), sulfato dodecílico sódico (SDS) al 20% y Proteinasa K [20 mg/ml]. Se dejó incubar por 14 h a 37° C y se adicionó después de dicho lapso NaCl saturado y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a tubos de 15 ml y el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y se agitará por inversión. Posteriormente, el ADN

se lavó en etanol frío al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y será resuspendido en ddH₂O, almacenándose a -20° C para su análisis posterior.

Se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría. Para conocer la calidad de las muestras se llevará a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Genotipificación por PCR en tiempo Real

El análisis de todos los polimorfismos de los diferentes genes que se estudiaron en este proyecto, se llevaron a cabo por discriminación alélica en PCR en tiempo real (la cual es una variante cuantitativa de la PCR) con sondas de hidrólisis de acuerdo con el sistema PCR allelic discrimination TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas las reacciones se realizaron con 10-20 ng de DNA, 2.5 µl de TaqMan Universal Master Mix 2x (AB), 0.25 µl de los primers y la sonda (40x) y agua a un volumen final de 10 µl. En todos los ensayos se incluyeron los controles negativos correspondientes. El PCR en tiempo real se realizó en el equipo Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, y 40 ciclos de amplificación (95°C por 15s y 60°C por 1 min). Para cada ensayo se utilizaron el TaqMan® SNP Genotyping Assays específico: C___1971047_10 para el SNP rs2073618 del gen de *OPG* y el C___11555860_10 para el SNP rs3020314 del gen *ESR1*.

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su artículo 17 el presente estudio se considera una investigación con riesgo mínimo. El estudio fue aprobado por las Comisiones Nacionales de Investigación Científica y Ética tanto del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado como por el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Todas las participantes que aceptaron ingresar al estudio, firmaron previamente una carta de consentimiento informado que permitió disponer de la información y las muestras de ADN (carta de consentimiento anexo 2). La forma de consentimiento informado se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos.

Asimismo, para conservar la privacidad y confidencialidad de los datos obtenidos en el cuestionario que se aplicará, así como los datos obtenidos del estudio de los polimorfismos, se utilizaron la base de datos, números de folio para identificar a las diversas mujeres participantes en el proyecto y de esa forma conservar el anonimato.

Los riesgos implícitos en la toma de las muestras de sangre, mismas que se solicitarán para la obtención del ADN, son considerados mínimos.

RESULTADOS

Se incluyeron 492 mujeres distribuidas de la siguiente manera: Casos - Fx (191) Controles 1- Normales (110) y Controles 2 - Osteoporosis (191). En la Tabla 1 se pueden observar las características generales de los tres grupos de estudio. Las características de cada grupo de la densidad mineral ósea se observan en la tabla 2.

La frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo *rs2073618* del gen *OPG* así como la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo *rs3020314* del gen *ESR1* son diferentes en los 3 grupos de estudio (Tabla 3 y 4).

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg determinó que tanto el polimorfismo *rs2073618* del gen *OPG* como el *rs3020314* del gen *ESR1* se encontraban en equilibrio ($P > 0.05$), ya que la distribución de los genotipos observados no difirió de los genotipos esperados en mujeres con fracturas osteoporóticas y en los controles (Tabla 3).

Al comparar los casos contra los controles 1 normales, se observó que el genotipo *rs2073618* de *OPG* presentó una razón de momios (RM) =1.607, con un intervalo de confianza (I.C.) al 95%= 0.641 – 2.630; $P = 0.58$. Por otra parte, al comparar los casos contra los controles 2 (osteoporosis) el genotipo *rs2073618* presentó una RM=1.426; I.C. al 95%= 0.930 – 2.188; $P = 0.103$); sin embargo en ninguna de los análisis se observó una asociación significativa del *rs2073618* y la presencia de fracturas osteoporóticas.

Con respecto al genotipo *rs3020314* del gen *ESR1* al comparar los casos contra los controles 1 normales, se observó una asociación significativa de dicho SNP con la

presencia de fracturas osteoporóticas (RM= 2.288, con un I.C. al 95%= 1.396 – 3.747; $P= 0.00091$). De igual forma, también se observó una asociación significativa con la presencia de fracturas osteoporóticas al comparar los casos contra los controles 2 (osteoporosis), presentando una RM= 2.021, con un I.C. al 95%= 1.315 – 3.108; $P = 0.00325$.

Por otro lado, al ajustar el modelo por posibles variables confusoras y correr el mejor modelo el polimorfismo *rs2073618* del gen *OPG* se pudo observar que también se asocia a la presencia de fracturas al igual que el polimorfismo *rs3020314* del gen *ESR1* de manera significativa. (Tabla 5 y 6).

Tabla 1. Características de la población por grupos.

Variable	Casos Media		Controles 1 Media		Controles 2 Media	
Índice de masa corporal	28		31		27.83	
Edad (años)	62		60		63	
Peso (kg)	65.1		72.9		62.5	
Exposición estrógenos (años)	33.69		33.50		33.54	
	Porcentaje / Media		Porcentaje / Media		Porcentaje / Media	
Consumo de alcohol	1.6%	0.02	.9%	0	1.1%	0.1
Tabaquismo	12.6%	1	18.9%	1.5	15.3%	2
Consumo de café (taza)	67.4%	0.82	71.2%	1.19	67.9%	0.8
Consumo refresco cola (ml/d)	40.5%	0.42	32.4%	0.38	35.3%	0.3
Consumo leche (vasos)	95.8%	1.17	91.9%	1.47	84.2%	1.03
Consumo de queso (g)		0.48		0.53		0.45
Consumo de tortillas	98.2%	4	97.2%	4	97.6%	4
	Porcentaje		Porcentaje		Porcentaje	
Lactancia (meses)	91.0%		77.5%		79.3%	
Ejercicio	15.8%		36.0%		26.8%	
Antecedente osteoporosis	13.6%		12.6%		22.8%	
Fractura vertebral	9%		-		-	
Fractura de cadera	26%		-		-	
Fractura de muñeca	65%		-		-	

Tabla 2. Densidad Mineral ósea.

	Total de densidad mineral ósea columna	g/cm ² columna	Total de densidad mineral ósea cadera	g/cm ² cadera
Fracturas	-2.96	0.746	-1.03	0.836
Control 1 Normal	0.65	1.03	0.89	1.035
Control 2 Osteoporosis	-3.14	0.702	-1.12	0.82

Tabla 3. Distribución del polimorfismo rs2073618 del gen OPG

Gen OPG Número de referencia Internacional rs2073618					Total
		Casos	Controles 1	Controles 2	
OPG	<i>Distribución genotípica</i>				
	C/C	43 (22.5%)	16 (14.5%)	30 (15.7%)	89 (18.1%)
	C/G	92 (48.2%)	50 (45.5%)	90 (47.1%)	232(47.2%)
	G/G	56 (29.3%)	44 (40 %)	71 (37.2%)	171(34.7%)
	<i>Frecuencia alélica</i>	190 (100 %)	110 (100%)	190 (100%)	492(100%)
	C	.46	.37	.39	
	G	.54	.63	.61	
	<i>Hardy-Weinberg</i>	p>0.05	p>0.05	p>0.05	

Tabla 4. Distribución del polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1*

Gen <i>ESR1</i> Número de referencia Internacional rs3020314		Grupo			Total
		Casos	Controles 1	Controles 2	
ESR1	<i>Distribución genotípica</i>				
	A/A	45 (23.5%)	12 (10.1%)	23 (12.1%)	80 (16.3%)
	A/G	95 (49.7%)	48 (44.4%)	87 (45.5%)	230(46.7%)
	G/G	51 (26.7%)	50 (45.5%)	81 (42.4%)	182 (37 %)
Total		193 (100%)	109 (100%)	190 (100%)	492 (100%)
<i>Frecuencia alélica</i>					
A		.48	.32	.35	
G		.52	.68	.65	
<i>Hardy-Weinberg</i>		p>0.05	p>0.05	p>0.05	

Tabla 5. Casos: Fractura vs Control 1: Normales

	Significancia Estadística	Razón de Momios	IC al 95%
Presencia de rs2073618 de <i>OPG</i>	.004	2.984	1.392-5.46
Presencia de rs3020314 de <i>ESR1</i>	.018	2.266	1.033-4.123
Alcoholismo	.883	1.199	.502-2.012
Consumo de refresco de cola	.147	.665	.265-1.021
Bajo Consumo de calcio en la dieta	.040	.990	.430-1.763
Tabaquismo	.073	1.914	.912-3.823
Lactancia	.0001	4.215	2.491-7.981
Antecedente heredofamiliar de osteoporosis	.019	1.696	.784-3.031
Sedentarismo	.021	2.34	1.272-4.231
IMC > 25 <30	.108	.056	.022-.963

Tabla 6. Casos: Fractura vs Control 2: Osteoporosis

	Significancia estadística	Razón de Momios	IC al 95%
Presencia de rs2073618 de <i>OPG</i>	.006	2.320	1.022-4.460
Presencia de rs3020314 de <i>ESR1</i>	.011	2.071	.949-4.002
Bajo consumo de calcio en alimentos	.041	1.111	.532-2.046
Tabaquismo	.056	1.87	.763-3.367
Lactancia	.0001	3.364	1.638-6.232
Antecedente heredofamiliar de osteoporosis	.024	1.747	.792-3.021
Alcoholismo	.876	1.163	.502-2.034
Consumo de refresco de cola	.677	.908	.306-1.871
Sedentarismo	.032	2.01	.903-3.863
IMC > 25 <30	.107	.054	.021-.971

DISCUSIÓN

Las tasas de fractura en todo el mundo están aumentando como resultado del envejecimiento de la población y la prevención, tanto primaria como secundaria, de tal forma que se considera un objetivo importante de salud pública. Por lo tanto, es necesaria una mejor comprensión de los numerosos factores de riesgo que contribuyen a las fracturas, con el fin de mejorar la aplicación de las modalidades preventivas, de diagnóstico y tratamiento de pacientes con una fractura.

La osteoporosis es una enfermedad común caracterizada por una disminución en la DMO, deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, así como un incremento en el riesgo de presentar fracturas por fragilidad (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; Peacock y cols., 2002; Lin y Lane, 2004).

Se ha descrito que la fractura por fragilidad en las vértebras es el sello distintivo de la osteoporosis; de igual forma, las fracturas de cadera son la consecuencia más grave de la osteoporosis y una de las principales causas de discapacidad y muerte entre las mujeres de edad avanzada y por lo tanto es la fractura más común observada en diversas poblaciones (Cooper y cols., 1992; Cooper y cols., 1993; Wasnich, 1996; Melton, 1997; Cauley y cols., 2007; Kanis y cols., 2008a); sin embargo, la frecuencia de las mismas en nuestra población, fue solo del 9% para vértebras y del 26%. Lo anterior pudiera ser que este tipo de fracturas en nuestra muestra poblacional fueron sub-diagnosticadas.

Se han descrito diversos factores de riesgo para fracturas, como es el IMC bajo, el cual se asocia a la presencia de las mimas (**De Laet y cols., 2005; Søgaard y cols, 2012**). Con respecto a nuestros resultados observamos que las mujeres con

facturas presentaron un IMC más bajo (28 kg/m^2) en comparación al grupo control 1 (con DMO normal) 31 kg/m^2 y similar a los controles 2 osteoporosis (27.83 kg/m^2). Al ajustar el modelo, el IMC bajo no permaneció como un factor de riesgo para fracturas por fragilidad. (RM=0.056, IC al 95%= 0.022-0.963 $P=0.108$ y RM=0.054, IC al 95%= 0.021-0.971 $P=0.107$). Lo anterior sugiere que nuestra población es diferente en comparación con otras poblaciones, en las cuales el IMC por debajo de lo normal se asocia a fracturas, ya que en el caso de nuestras pacientes con fracturas, el IMC corresponde a sobrepeso y el de las mujeres controles con DMO normal a obesidad grado I (WHO, 2000).

Otros factores que se asocian a la presencia de fractura en este modelo fueron los antecedentes familiares de osteoporosis RM=1.696, IC al 95%= 0.784-3.03, $P= 0.019$ así como la falta de actividad física RM=2.34, IC al 95%= 1.272 – 4.231, $P=0.021$ al comparar nuestras pacientes fracturadas con los controles normales; al comparar con los controles 2 (osteoporosis), ambos factores (antecedentes familiares de osteoporosis RM=1.747, IC= .792 – 3.021, $p=.032$ y la falta de actividad física RM=2.01, IC= 0.903 – 3.863, $P=0.032$) siguen asociándose de manera significativa tal como lo reportan Peacock y cols.(2012); así como por Riggs y cols., (2002).

El tabaquismo en nuestra población solo se presentó alrededor del 15% en nuestros 3 grupos; por lo que no se asocio de manera significativa a la presencia de fracturas al comparar los casos *versus* los controles 1 y 2 (RM=1.914, IC al 95%=.912-3.823, $P=0.073$ y RM=1.87, IC al 95%=0.763 - 3.367 $P=0.056$, respectivamente). El bajo consumo de calcio en la dieta tampoco se asocio significativamente a la presencia de fracturas al comparar los casos *versus* los controles 1 y 2 (RM=0.990, IC al 95%= 0.430 – 1.763, $P=0.40$ y RM=1.11, IC al

95%= 0.532- 2.046, $p=.041$) en contraste con lo reportado por Peacock y cols., (2002) así como por Riggs y cols (2002). Por otra parte, no se encontró asociación de bebidas alcohólicas y el consumo de bebidas con cafeína con la presencia de fracturas al comparar los casos *versus* los controles 1 y 2, lo que está de acuerdo a lo descrito previamente (Wu y cols., 2002).

En forma interesante, observamos al comparar los casos *versus* los controles 1 y 2, que el factor de riesgo que se asoció de manera importante a la presencia de fracturas en nuestra población, fue la lactancia acumulada, con una RM=4.21, IC al 95%= 2.491-7.981, $P=0.0001$ y una RM=3.36, IC al 95%=1.638- 6.232, $p=0.0001$, respectivamente. Lo anterior confirma los resultados previos reportados por nuestro grupo de investigación en relación a los factores de riesgo para osteoporosis en nuestra población (Rojano y cols. 2011).

Por otra lado, los factores genéticos juegan un rol importante en la patogénesis de las fracturas por fragilidad, por mecanismos complejos que implican variación en diversos genes que regulan la DMO, así como la geometría del hueso y la calidad (Peacock y cols., 2002).

Se han descrito diversos genes candidatos para la predisposición a presentar fracturas por fragilidad con es el gen *OPG* y el gen *ESR1*. La osteoprotegerina juega un rol clave en la remodelación del hueso e inhibe la resorción ósea. En el modelo animal, los ratones nulos para *Opg*, desarrollan osteoporosis temprana grave (Bucay y cols., 1998; Mizuno y cols., 1998); por el contrario lo ratones transgénicos que sobreexpresan *Opg* desarrollan osteopetrosis (Simonet y cols., 1997). Con base en esas evidencias, se propone que el gen *OPG* pudiera intervenir en el desarrollo de fracturas por fragilidad. Se ha descrito en diversos estudios, que el polimorfismo K3N (*rs2073618*) en este gen, específicamente el alelo C (Asn) se asocia a un

incremento de la DMO en columna lumbar, disminuye el riesgo de osteopenia/osteoporosis, así como el riesgo de presentar fracturas (Langdahl y cols., 2002; Arki y cols., 2005; Zhao y cols., 2005; Moffet y cols., 2008); sin embargo, otros estudios no han demostrado dicha asociación (Wynne y cols., 2002, Brändström y cols., 2004).

Con respecto a nuestros resultados en relación a este polimorfismo, observamos que al comparar los casos tanto contra los controles 1 como los controles 2, no se observó asociación. Sin embargo, una vez que realizamos el ajuste de los factores confusores, si observamos una asociación estadísticamente significativa entre el alelo de riesgo de K3N y presencia de osteoporosis; con una RM= 2.984, I.C. al 95%=1.392-5.46, $P= 0.004$ y una RM= 2.320; I.C. al 95%=1.022-4-460; $P= 0.006$, al comparar el grupo de casos vs controles 1 y casos vs controles 2, respectivamente (Tablas 5 y 6). En formas interesante, nuestros resultados fueron inversos a los descritos por Moffett y cols., (2008) para población caucásica; es decir, el alelo de riesgo para nuestra población que se asoció a la presencia de fracturas por osteoporosis fue el alelo G y para la población de origen caucásico es el alelo C.

En relación a la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo K3N del gen *OPG*, observamos que ésta fue diferente a lo descrito en la literatura para mujeres de origen caucásico y asiático (Langdahl y cols., 2002; Choi y cols., 2005; Zhao y cols., 2005; Vidal y cols., 2006; Moffet y cols., 2008) y aún entre nuestros tres grupos de estudio analizados. En contraste con las poblaciones caucásicas y asiáticas en las que el genotipo CC (Asn/Asn) fue el más frecuente y también se asoció con un aumento de la DMO en la columna lumbar (Langdahl y cols., 2002; Choi y cols., 2005; Zhao y cols., 2005; Vidal y cols., 2006; Moffet y cols., 2008), en nuestra

población se observó una baja frecuencia de este genotipo. En el caso de nuestra población predominó el alelo G y el genotipo GG. En forma interesante, esta frecuencia inversa de alelos y genotipos ya se había descrito por el grupo de Rojano y cols. (2012), en un estudio poblacional de osteoporosis en mujeres de origen étnico. Por lo tanto, las diferencias en las frecuencias alélicas reportadas por otros autores [4-6,10-14,29] y lo observado en este estudio, pudieran ser debido a antecedentes genéticos, porque la población mestiza-Mexicana se compone de una mezcla de europeos y africanos con los nativos indígenas de nuestra población (Lisker y cols., 1990).

En las mujeres posmenopáusicas la deficiencia de estrógenos es una de las causas principales para el desarrollo de osteoporosis (Riggs y cols., 2002). Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la deficiencia del gen *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 (Gallagher y cols., 1993, Cheng y cols., 2002; Riggs y cols., 2002; Riggs y cols., 2003; Jessop y cols., 2004; Syed y Khosla, 2005). Además, la importancia que tiene el gen *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 (Smith y cols., 1994).

En base a esta evidencia, se propuso que el gen *ESR1* pudiera tener asociación con la presencia de fracturas, lo cual confirmamos al estudiar el polimorfismo *rs3020314* [NM_000125.2:c.1096+5029C>T] en los casos contra los controles 1 y *versus* los controles 2 (RM=2.28, IC al 95%= 1.396 – 3.747, *P*=.0001 y

RM=2.021, IC al 95%= 1.315 – 3.108, $P=0.0001$, respectivamente). Nuestros resultados están de acuerdo con lo recientemente descrito por Wang y cols., (2008), en el cual si encontraron asociación con la presencia de fracturas en la población de origen asiático. En el caso de nuestra población predominó el alelo G y el genotipo GG.

Al correr un modelo de regresión lineal. la presencia del polimorfismo rs2073618 del gen *OPG* y el polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1* se siguen asociando de manera significativa a la presencia de fracturas osteoporóticas en mujeres posmenopáusicas. Al comparar los casos contra los controles 1 (normales) (RM= 2.26, IC al 95%=1.033 – 4.123, $P=0.018$) y al comparar los casos contra los controles 2 (RM=2.071, IC al 95%= 0.949- 4.460, $P=0.006$).

La mayor asociación observada en nuestra población con respecto a la presencia de fracturas, fue la observada para el polimorfismo de rs3020314 del gen *ESR1*, lo que coincide con lo reportado por Wang y cols., (2008), en la población de origen étnico Chino.

Finalmente, es necesario subrayar que a pesar de que los factores ambientales (Peacock y cols. 2002) muestran un papel importante en la presencia de fracturas osteoporóticas, una vez que ajustamos por nuestros factores de riesgo, observamos que en nuestra población los factores genéticos (en este caso los polimorfismos rs2073618 del gen *OPG* y el polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1*), presentaron un rol determinante en la presencia de fracturas por fragilidad.

CONCLUSIONES

- El presentar al menos un polimorfismo (rs2073618 del gen *OPG* o el polimorfismo rs3020314 del gen *ESR1*), se asocia a la presencia de fracturas por fragilidad en nuestra población de estudio.
- De tal forma, que pudiera ser considerado ambos polimorfismos como posibles marcadores genético para presencia de fracturas en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

REFERENCIAS

Albright F, Bloomberg E, Smith PH. Postmenopausal osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians.* 1940;55:298-305.

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.

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.

Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas.* 2005;51:270-9.

Atkinson PJ. Changes in resorption spaces in femoral cortical bone with age. *J Pathol Bacteriol.* 1965;89:173-8.

Atkinson PJ. Variation in trabecular structure of vertebrae with age. *Calcif Tissue Res.* 1967;1:24-32.

Baldock PA, Eisman JA. Genetic determinants of bone mass. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:450-6.

Bernis C, Reher DS. Environmental contexts of menopause in Spain: comparative results from recent research. *Menopause.* 2007;14:777-87.

Black DM, Palermo L, Nevitt MC, Genant HK, Christensen L, Cummings SR. Study of osteoporotic fractures research group. Defining incident vertebral deformity; a prospective comparison of several approaches. *J Bone Miner Res.* 1999;14:90-101.

Brändström H, Gerdhem P, Stiger F, Obrant KJ, Melhus H, Ljunggren O, Kindmark A, Akesson K. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:18-24.

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.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-8.

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.

Carranza-Lira S, Rosas M, Murillo A, Martinez N, Santos J. Osteoporosis in postmenopausal women (Mexico City): 2. Validation of a predictive clinical index. *Int J Fertil Womens Med.* 2002;47:26-31.

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.

Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Shin CS, Kim H, Lee KM, Lee KH, Kang C, Cho DY, Kang D. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005;77:152–9.

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.

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.

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.

Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;646-650.

Cooper A, Cooper BB. A treatise on dislocation, and on fractures of the joints. Churchill. London, United Kingdom. 1822, p 425.

Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd 1992 Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. *Osteoporos Int* 2:285-9

Cooper C, O'Neill T, Silman A. The epidemiology of vertebral fractures. European Vertebral Osteoporosis Study Group. *Bone*. 1993;14 Suppl 1:S89-97.

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.

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*. 2002;359:1761-7.

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.

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.

De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ 3rd, Meunier PJ, Pols HA, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16:1330-8.

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.

Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 1999;20:788-804.

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.

Gallagher A, Chambers TJ, Tobias JH. The estrogen antagonist ICI 182,780 reduces cancellous bone volume in female rats. *Endocrinology.* 1993;133:2787-91.

García-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, Sañudo C, Berja A, Valero C, Pesquera C, Paule B, González-Macías J, Amado JA. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res.* 2008;40:219-24.

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

Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D. Mortality after admission to hospital with fractured neck of femur: database study. *BMJ.* 2002;325:868-9.

Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:573-8.

Harris SS, Patel MS, Cole DE, Dawson-Hughes B. Associations of the collagen type Ialpha1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. *Calcif Tissue Int.* 2000;66:268-71.

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.

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.

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.

John SWM, Weizner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:408

Johnell O, Gullberg B, Allander E, Kanis JA. The apparent incidence of hip fracture in Europe: a study of national register sources. MEDOS Study Group. *Osteoporos Int.* 1992;2:298-302.

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.

Kanis JA, McCloskey EV. Risk factors in osteoporosis. *Maturitas.* 1998;30:229-33.

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.

Kanis JA, Seeman E, Johnell O, Rizzoli R, Delmas P. The perspective of the international osteoporosis foundation on the official positions of the international society for clinical densitometry. *J Clin Densitom.* 2005;8:145-7.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int.* 2008;19:385-97.

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.

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltsev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008b;42:467-75.

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.

Kannus P, Palvanen M, Niemi S, Parkkari J, Järvinen M, Vuori I. Osteoporotic fractures of the proximal humerus in elderly Finnish persons: sharp increase in 1970-1998 and alarming projections for the new millennium. *Acta Orthop Scand.* 2000;71:465-70.

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.

Kiel D. National Osteoporosis Foundation Working Group on vertebral fractures. Assessing vertebral fractures. *J Bone Miner Res.* 1995;10:518-23.

Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause.* 2007;14:913-8.

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.

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.

Koval KJ, Zuckerman JD. Fracturas del cuello femoral. En: Koval KJ, Zuckerman JD, eds. *Fracturas y Luxaciones.* Morban, España, 2003, p.p. 198-199.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle

WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-76.

Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1245-55.

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.

Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;425:126-34.

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.

Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791–801.

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.

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.

Melton LJ 3rd. Epidemiology of spinal osteoporosis. *Spine*. 1997;22:2S-11S.

Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporos Int*. 1999;10:214-21.

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.

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.

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.

Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:610-5.

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.

Murrillo-Urbe 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.

National Osteoporosis Society Website. Available at <http://www.nos.org.uk> Accessed 4th January, 2007.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. JAMA 2001;285:785-95.

Nevitt MC, Ettinger B, Black DM, Stone K, Jamal SA, Ensrud K, Segal M, Genant HK, Cummings SR. The association of radiographically detected vertebral fractures with back pain and function: a prospective study. Ann Intern Med. 1998;128:793-800.

Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. J Bone Miner Res. 2000;15:392-401.

Nilas L, Christiansen C. Bone mass and its relationship to age and the menopause. J Clin Endocrinol Metab. 1987;65:697-702.

Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. J Hum Genet. 2002;47:400-6.

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.

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.

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.

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.

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.

Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:303-26.

Ralston SH. The genetics of osteoporosis. *QJM.* 1997;90:247-51.

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.

Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115:3318-25.

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.

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.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002;23:279-302.

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.

Rojano-Mejía D, Coral-Vázquez RM, Cortes Espinosa L, Romero-Hidalgo S, López-Medina G, Aguirre-García MC, Coronel A, Ibarra R, Canto P. *TNFRSF11B* gene haplotypes and its association with bone mineral density variations in postmenopausal Mexican Mestizo women. *Maturitas.* 2012; 71 (1): 49-54

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;15:308-14.

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.

Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:103-6.

Schapira D, Schapira C. Osteoporosis: the evolution of a scientific term. *Osteoporos Int.* 1992;2:164-7.

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.

Sharma S, Fraser M, Lovell F, Reece A, McLellan AR. Characteristics of males over 50 years who present with a fracture: epidemiology and underlying risk factors. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90:72-7.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D,

Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309-19.

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.

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.

Søgaard AJ, Meyer HE, Ahmed LA, Jørgensen L, Bjørnerem A, Joakimsen RM, Emaus N. Does recalled dieting increase the risk of non-vertebral osteoporotic fractures? The Tromsø Study. *Osteoporos Int*. 2012 Feb 7.

Spencer SJ. Lack of knowledge of osteoporosis: a multi-centre, observational study. *Scott Med J*. 2007;52:13-6.

Styrkarsdottir 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.

Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:688-96.

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.

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.

Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2006;53:386–95.

Wang JT, Guo Y, Yang TL, Xu XH, Dong SS, Li M, Li TQ, Chen Y, Deng HW. Polymorphisms in the estrogen receptor genes are associated with hip fractures in Chinese. *Bone.* 2008; 43 :910 -914.

Wasnich RD. Vertebral fracture epidemiology. *Bone.* 1996;18:179S-183S.

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.

Wilund KR, Tomayko EJ, Evans EM, Kim K, Ishaque MR, Fernhall B. Physical activity, coronary artery calcium, and bone mineral density in elderly men and women: a preliminary investigation. *Metabolism.* 2008;57:584-91.

World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series 1994;843. WHO, Geneva.

World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894:1-253

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.

Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int.* 2002;71:26-35.

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.

Zhao HY, Liu JM, Ning G, Zhao YJ, Zhang LZ, Sun LH, Xu MY, Uitterlinden AG, Chen JL. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2005;16:1519-24.

ANEXO 1

Cuestionario de Factores de Riesgo para Osteoporosis.

Nombre _____

Edad _____

Lugar de Residencia _____ Tiempo

LUGAR DE NACIMIENTO DE:

Paciente

De su padre _____ de su madre

Abuelos Paternos

Abuelos maternos

Peso _____ kg. Estatura _____ m. Índice de masa
corporal _____

Antecedentes de osteoporosis en su familia (abuelas, tías, hermanas, etc)

Tiene antecedentes de fracturas (vértebras, cadera) en sus familiares antes de los
50 años de edad: (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí,

¿Quiénes? _____

Antecedentes personales: (diabetes, hipertensión arterial; artritis, histerectomía)

Especifique tratamiento y tiempo

Edad de la menarca _____

¿Tuvo hijos? (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿cuántos? _____

Dio lactancia

Sí la respuesta es sí ¿cuánto tiempo?

Edad de menopausia _____

Tiempo transcurrido desde el cese permanente de la última menstruación (año)

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

Sí la respuesta es sí ¿desde

cuándo? _____ ¿Qué tipo de

estrógenos? _____ Dosis _____

Utilizó anticonceptivos (hormonales) con estrógenos: (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿cuánto

tiempo? _____

¿Qué tipo de

anticonceptivos? _____

Dosis _____

Utiliza o utilizó tratamiento con glucocorticoides: (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿desde cuándo? _____ o ¿Cuánto

tiempo? _____

O ¿Cuándo lo suspendió?

Realiza ejercicio físico (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿De qué tipo, cuánto tiempo y con qué frecuencia lo realiza?

Fuma (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿cuántos cigarros fuma a la semana? _____

Desde cuando _____ Marca de

Cigarrillos _____

Ingiere bebidas alcohólicas más de una vez por mes (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿Cuántas copas o cervezas?

¿Desde cuándo? _____ Tipo de bebida

Ingiere Café más de una vez por semana (Sí) (No)

Sí la respuesta es sí ¿Cuántas tazas bebe a la semana o al día? _____

¿Desde cuándo? _____ tipo de café

Acostumbra beber refresco más de una vez por semana (Sí) (No)

Sí la respuesta fue sí ¿Cuántos vasos de refresco toma por semana o día?
_____ ¿desde cuándo? _____ Marca de refresco más frecuente

Consume leche o derivados lácteos más de una vez por semana (Sí) (No)
Sí la respuesta es sí ¿Cuántas veces por semana o por
día? _____
¿Desde cuando? _____ ¿De qué tipo?

Consume tortillas (Sí) (No)
Sí la respuesta es sí ¿desde qué edad, número y cuántas veces por
día? _____

Actualmente ingiere calcio, vitamina D (o algún complemento dietético) (Sí)
(No)
Sí la respuesta es sí especifique tipo y dosis

¿Desde cuándo?

COMENTARIOS

Aplico: Nombre _____ Fecha _____

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUJERES POSTMENOPÁUSICAS

México, D.F., a _____

Por medio de la presente yo,

autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado **“POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE *OPG* Y *ESR1* COMO MARCADORES DE RIESGO GENÉTICO PARA LA PRESENTACIÓN DE FRACTURAS OSTEOPORÓSTICAS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS”**

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 fractura por osteoporosis.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: **completar un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar fractura por osteoporosis (como dieta, ingesta de alimentos, medicamentos etc)**, la toma de una muestra única de 5 ml 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 hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.
- b) por la extracción de sangre: ninguno
- c) por la prueba de medición de la 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 participan en el estudio se les llevará a cabo el estudio de la densitometría ósea (método de 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 fractura 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 fracturas por 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 esta muestra además será almacenada a -20°C durante un período de 15-20 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 me 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 o HGM 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 la 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.

Investigador Responsable
Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Señora

Dra. Castañeda Pérez Nayeli

Testigo