



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**POLIMORFISMOS GÉNICOS RELACIONADOS CON FRACTURAS DE
CADERA EN MUJERES MEXICANAS.**

T E S I S
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
MÉDICAS.**

PRESENTA:
DR. JORGE RAMIREZ ZENTENO

**TUTOR: DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES, PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD.**

MÉXICO D.F. MARZO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen	3
Antecedentes	4
Justificación	11
Pregunta de Investigación	11
Hipótesis	11
Objetivos	12
Tipo de Investigación	12
Universo de Trabajo	12
Grupos de Estudio	12
Evaluación Densitométrica	13
Identificación de Factores de Riesgo	13
Tamaño de la Muestra	14
Variables de Estudio	14
Estudios Moleculares para Identificación de Diferentes Polimorfismos	15
Resultados	16
Discusión	19
Referencias	25
Anexo 1	29
Anexo 2	30

Resumen

Las fracturas de cadera son la complicación más aparatosa y costosa de la osteoporosis (OP), siendo ésta última la principal causa de fracturas de cadera en mujeres mayores de 50 años. La OP se distingue por presentar disminución progresiva de la masa ósea y distorsión de la microarquitectura del hueso lo que conduce a un aumento en la fragilidad del tejido que ocasiona un aumento en el riesgo para presentar fracturas. La OP primaria tiene un origen multifactorial y poligénico, resultando así de la interacción de múltiples factores ambientales (alimentación, actividad física, ingesta de fármacos, condición hormonal, etc.) y de origen genético. Diversas investigaciones han revelado que la OP presenta un gran componente genético ya que diversos trabajos, sobre todo estudios de asociación han explorado la magnitud y el impacto de los factores genéticos en la génesis de la OP. De tal forma que el presente trabajo tuvo como objetivo analizar dos polimorfismos tipo SNPs, uno en el gene RANK (rs3018362) y otro en el gen RANKL(rs12585014) en dos grupos de mujeres mexicanas mayores de 50 años, uno con antecedente de fractura de cadera y otro sin antecedente de esta lesión. En ambos grupos de participantes se descartó la presencia de enfermedades óseas concomitantes, enfermedades metabólicas con afección grave en hueso así como la ingesta de fármacos cuyos efectos secundarios afectaran al tejido óseo. La hipótesis planteada sugiere la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas y/o genotípicas de los polimorfismos en ambos grupos de estudio. Para éste fin, previo consentimiento informado de las participantes y extracción de DNA proveniente de leucocitos de sangre periférica se realizó mediante PCR en tiempo real la identificación de alelos y genotipos de cada variante genética para el posterior análisis de frecuencias. Es importante mencionar que en cada participante y en ambos grupos se recolectó información relacionada con la presencia de factores de riesgo relacionados con OP. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos y en ninguno de los casos se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles, no obstante, en este momento no podemos ser concluyentes y descartar una posible asociación genotipo-fenotipo hasta analizar un número mayor de casos y controles, incluso se buscará analizar otras variaciones en estos mismos genes además de las del propósito de este estudio con el fin de realizar un análisis de haplotipos.

Antecedentes

La osteoporosis (OP) es una enfermedad caracterizada por la disminución progresiva de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del hueso lo que conduce a un aumento en la fragilidad del tejido con el consecuente riesgo de fractura. Podemos reconocer dos formas de OP, la primaria y la secundaria, la primera es la forma más común de la enfermedad y resulta de la pérdida progresiva de la masa y microarquitectura ósea que ocurre de manera natural en la vida adulta, su origen es considerado multifactorial y poligénico. En la actualidad, esta forma representa uno de los problemas de salud crecientes en el mundo, debido entre otras cosas a las condiciones ambientales propias de las civilizaciones modernas y por supuesto al incremento en la esperanza de vida de las poblaciones. (1-3).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la OP el quinto problema de salud pública en el mundo, en México, se estima que 2.1 millones de personas mayores de 60 años tienen OP y 1.4 millones presentan osteopenia (fase primaria de la enfermedad). Debemos señalar que como consecuencia del incremento en la esperanza de vida de nuestra población y el aumento de condiciones ambientales que predisponen a este desorden es de esperarse un incremento importante de las cifras ya referidas. Publicaciones recientes refieren que actualmente en México, la población de 50 años ó más es de 19 millones y se predice que para el año 2050 oscile entre los 55 millones, lo que supone un envejecimiento notable de nuestra población, el cual inevitablemente se acompañará de un incremento en la frecuencia de enfermedades crónico degenerativas y sus respectivas complicaciones, en este grupo de enfermedades la OP ocupa y seguirá ocupando un lugar importante (4-7).

En la génesis y fisiopatología de la OP existen dos grandes categorías en cuanto a factores de riesgo, una está representada por los factores ambientales, considerados también como “modificables”, entre ellos encontramos la actividad física, los hábitos alimenticios, consumo de café, tabaco, alcohol y los trastornos de la conducta alimenticia. La segunda categoría comprende las condiciones o factores de riesgo “no modificables” que incluyen el género, edad, raza, así como la historia personal y familiar de fracturas, estos últimos son un reflejo indirecto del grado de susceptibilidad genética para esta enfermedad (8-9).

Existen en general dos tipos de osteoporosis, la primaria (posmenopáusica o senil) y la secundaria (asociada a enfermedades endócrinas, reumáticas, medicamentos, etc). Se han identificado múltiples factores de riesgo con relación a OP (edad avanzada, sexo

femenino, raza blanca, peso corporal. historia familiar de fracturas, menopausia temprana, tabaquismo, ingesta excesiva de alcohol, factores nutricionales, pobre actividad física y algunas enfermedades endócrinas. Con respecto a la osteoporosis secundaria podemos decir que comprende un gran y heterogéneo grupo de condiciones primarias capaces de favorecer la presencia de osteoporosis, la tabla 1 muestra algunas de las condiciones relacionadas con OP primaria y secundaria (8-9).

Tabla1.- Clasificación de la osteoporosis y causas que la originan.

Tipo de osteoporosis	Causas que la originan
Primaria	Multifactorial, poligénica. Senil/Involucional
Secundaria	Fármacos que deterioran la calidad ósea; anticonvulsivos, antidepresivos, anticoagulantes, antiácidos que contienen aluminio, inhibidores de la aromatasa, barbitúricos, cimetidina, corticosteroides, glucocorticoides, anticonceptivos, antineoplásicos, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), diuréticos de asa, metrotexate, fenobarbital, fenotiazinas, entre otros.
	Otras entidades; nefropatías, síndromes de malabsorción, neoplasias, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, cualquier entidad que condicione poca movilidad ó inmovilidad prolongada
	Enfermedades metabólicas; diabetes, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo.
	Hipogonadismo; Síndromes de Turner y Klinefelter.
	Desordenes de conducta; anorexia nerviosa, depresión, inactividad física prolongada, desnutrición, consumo elevado de cafeína, tabaquismo y/o alcoholismo crónico.
	Enfermedades monogénicas; osteogénesis imperfecta, síndrome de glioma, osteoporosis,

La cantidad y calidad de masa ósea que presenta un individuo depende de varios factores, uno de ellos se conoce como “pico de masa ósea” (PMO) y se refiere al máximo de masa ósea que alcanza un sujeto, esto ocurre entre los 20-30 años de edad. Este PMO resulta de la interacción de factores genéticos y ambientales. Una vez que se alcanza el PMO, de manera natural ocurre una pérdida progresiva de la masa ósea que depende de la magnitud y velocidad de pérdida ósea subsecuente, se estima que el promedio anual de pérdida en las mujeres postmenopáusicas es de 1-2% y de 0.2-0.5% en los varones y se considera que cerca del 30% de las mujeres postmenopáusicas presentan una fase rápida de pérdida ósea (5% al año aproximadamente) durante los primeros 5 años después de la menopausia, esto por supuesto implica mayor riesgo de presentar fracturas osteoporóticas en esta edad (4).

La OP puede permanecer latente e incluso agravarse durante muchos años sin producir sintomatología significativa, es por eso que se le conoce como “la epidemia silenciosa”, dentro de la sintomatología es posible encontrar solamente dolor óseo crónico, sobre todo de espalda, circunstancia que puede ser atribuida a la presencia de microfracturas y es frecuente la pérdida progresiva de estatura debido a compresión vertebral. Cuando el desgaste vertebral es heterogéneo la configuración anatómica normal de la columna se pierde dando lugar a escoliosis (9).

La complicación más frecuente y peligrosa de la OP son las fracturas, las cuales pueden ocurrir ante traumas muy leves e incluso de manera espontánea y a pesar de que cualquier hueso es susceptible de fracturas, los sitios en donde ocurren con mayor frecuencia son columna vertebral, cadera y muñeca; de éstas, sin duda, las más aparatosas y de difícil manejo son las fracturas de cadera. Incluso, se ha considerado que el 25% de los afectados por estas fracturas mueren a consecuencia de las complicaciones y otro 25% (incluso con tratamiento quirúrgico), no recuperan la calidad de vida previa a la fractura. Por otra parte, los pacientes que han sufrido una o más fracturas (en cualquier sitio), muestran mayor predisposición a presentar nuevas fracturas, independientemente del valor de su densidad mineral ósea (DMO), cuanto más temprana la edad a la que se produjo la primera fractura y cuanto mayor el número de fracturas previas, mayor será el riesgo de nuevas fracturas (8-9).

El método más común para diagnosticar la OP es la densitometría ósea radiológica de doble energía (DXA), éste representa en la actualidad el método más rápido, completo y de mayor precisión para determinar la DMO. De acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se establece el diagnóstico de OP cuando el rango de la DMO del sujeto esta por debajo de 2.5 desviaciones estándar (DE) y osteopenia cuando el valor de esta densidad es inferior a 1 DE, pero superior a 2.5 DE del valor medio normal de las personas jóvenes de igual sexo y raza. El DXA evalúa el contenido mineral óseo (BMC) en gramos dividido entre el área del hueso (BA) en cm^2 lo que nos da una medición de la BMD en g/cm^2 , en donde el T-score es el valor usado para el diagnóstico de OP, éste se calcula sustrayendo la BMD media (de la población joven adulta) de la BMD del paciente y dividida entre la SD de la población adulta joven, mientras que el valor Z, se usa para comprar la BMD del paciente a la de sus iguales, éste se calcula restando la BMD media (de una edad, etnia y sexo similar) menos la BMD del paciente entre la SD de la población de referencia, es recomendable que las diferentes mediciones se realicen con un

mismo equipo para evitar sesgos de medición, en la tabla 2 se muestran los puntos de cohorte para el diagnóstico de osteoporosis, osteopenia y valores normales (1,9).

Tabla 2. Puntos de cohorte establecidos por la OMS para el diagnóstico de osteoporosis.

Categorías Diagnósticas de Osteopenia y Osteoporosis basado en la Medición de BMD por DXA	
Categoría	Masa Ósea
Normal	Valor de BMD dentro de 1 SD de la media de referencia de mujeres adultas jóvenes (T-score ≥ 0 a 1SD)
Osteopenia (baja masa ósea)	Valor de BMD > 1 pero $<$ de 2.5 SD debajo de la media de referencia de mujeres adultas jóvenes (T-score < -1 y > -2.5 SD)
Osteoporosis (OP)	Un valor de BMD de 2.5 o más SD debajo de la media de mujeres adultas jóvenes (T-score < 0 a -2.5)
Severa (OP avanzada)	Valor de BMD $>$ de 2.5 SD debajo de la media de mujeres adultas jóvenes en presencia de 1 o más fracturas por fragilidad.
Fuente: WHO, Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Summary report of a WHO Scientific Group. 2007	

Se ha demostrado que en la génesis de la OP los factores genéticos juegan un papel importante en la regulación no sólo de la DMO sino también en las propiedades ultrasonográficas del hueso, la geometría esquelética, el recambio óseo y en otros aspectos del metabolismo óseo, contribuyendo de manera importante en la patogénesis de la fractura osteoporótica, no obstante, queda claro que en la mayoría de los casos esta enfermedad es causada por el efecto combinado de alteraciones en diferentes genes y su interacción con diversas condiciones ambientales (10-13).

Sabemos ya que existen diferencias étnicas, de género incluso familiares con relación a la densidad mineral ósea (DMO) e incidencia de fracturas por OP, generalmente, las mujeres muestran una DMO menor que los varones del mismo grupo étnico o racial, las mujeres de raza blanca caucásica muestran mayor incidencia de fracturas que las mujeres hispánicas o de raza negra, mientras que en las mujeres asiáticas se han informado valores de DMO intermedios con respecto a los grupos ya señalados. Es importante mencionar que investigaciones nacionales han reportado ya diferencias en los valores de la DMO de las mujeres del norte, centro y sur de nuestro país. En este sentido, se ha reconocido una mayor DMO en las mujeres del norte, baja DMO en mujeres del sur e intermedia en las mujeres del centro del país, estas diferencias pueden

estar dadas por condiciones ambientales y de estilo de vida y posiblemente por diferencias en la estructura genética de las poblaciones (2,5-6).

Investigaciones internacionales estiman que la heredabilidad de la DMO oscila entre 70-85% en columna vertebral y cadera y 50-60% en radio distal. Existen además otros determinantes óseos, con evidente componente hereditario como son la geometría y la longitud del cuello femoral, las propiedades ultraestructurales del hueso (que traduce el grado de interconectividad trabecular) y la velocidad de remodelado óseo. Por otra parte la historia familiar de fracturas en cadera ha mostrado ser consistentemente un factor de riesgo, independiente a la DMO. Cabe señalar que estudios en gemelos estiman que la heredabilidad de las fracturas por sí misma oscila entre 25-35% (11-16).

Tal y como se señaló los factores genéticos juegan un papel determinante en la estructura y metabolismo óseo por lo que la cantidad de genes implicados de diferentes maneras en el fenotipo óseo es importante, algunos de los más estudiados son los genes COL1A1, COL1A2, ESR1, ESR2, CT, VDR, IL1, IL4, IL11, IL6, LRP5, TGF-beta, OPG, RANK, RANKL, HOXA10, P53, CATK, APOE, PTH, CALCAR, etc., todos estos genes codifican para proteínas que de alguna u otra forma repercuten sobre el fenotipo óseo (11-16), en la tabla 3 se muestran algunos de éstos genes.

Tabla 3.- Genes relacionados con el fenotipo óseo (15-51).

Gen	Producto	Proceso metabólico relacionado
<i>VDR</i>	Receptor de vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D3)	Genes involucrados en la vía endocrina de la vitamina D
<i>DBP</i>	Proteína de unión al sitio D del promotor de albumina (albumina D-box)	
<i>ESR1</i>	Receptor de estrógenos alfa	Genes involucrados en la vía endócrina de los estrógenos
<i>ESR2</i>	Receptor de estrógenos beta	
<i>ESRRA</i>	Receptor alfa relacionado con estrógenos	
<i>ESRRG</i>	Receptor relacionado a estrógenos gama	
<i>CYP19A1</i>	Citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1	
<i>CYP17A1</i>	Citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1	
<i>UGT2B17</i>	UDP Glucuronosiltransferasa, familia 2, polipéptido B17	
Vía de señalización Wnt/beta		
<i>LRP5</i>	Proteína 5 relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad	Genes involucrados en la vía de señalización Wnt/beta Catenina
<i>LRP6</i>	Proteína 6 relacionada al receptor de	

	lipoproteínas de baja densidad	
<i>LRP4</i>	Proteína 4 relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad	
<i>SOST</i>	Esclerostina	
<i>DKK2</i>	Dickkopf homólogo 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	
<i>FZD1</i>	Receptor 1 de familia rizado	
<i>SFRP1</i>	Proteína 1 secretada relacionado a rizado	
<i>SFRP4</i>	Proteína 4 secretada relacionado a rizado	
<i>WNT10B</i>	Familia del sitio de integración MMTV tipo sin alas, miembro 10B	
<i>WNT3A</i>	Familia del sitio de integración MMTV tipo sin alas, miembro 3 ^a	
<i>CTNNB1</i>	Catenina, beta1	
<i>APC</i>	Proteína de colon polipósico adenomatoso	
<i>FOXC2</i>	Proteína con cabeza de asa Box C2	
Vía RANK/RANKL/OPG		
<i>OPG</i>	<i>TNFRSF11B</i>	Genes relacionados con la osteoclastogénesis
<i>RANK</i>	<i>TNFRSF11A</i>	
<i>RANKL</i>	<i>TNFRSF</i>	
Superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta)		
<i>TGFB1</i>	Factor de crecimiento transformante beta 1	Genes de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF beta)
<i>BMP2</i>	Proteína morfogénica de hueso 2	
<i>BMP4</i>	Proteína morfogénica de hueso 4	
<i>BMP7</i>	Proteína morfogénica de hueso 7	
<i>BMPIB</i>	Receptor de la proteína morfogénica de hueso 1B	
<i>SMAD6</i>	Familia SMAD miembro 6	
<i>TGFBR3</i>	Receptor III del factor de crecimiento transformante beta	
<i>SPTBN1</i>	Espectrina beta, no eritrocítico 1	
Fuente: Li WF, Hou SX, Yu B. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. Hum Genet (2010) 127:249–285		

En el hueso así como en el resto de los tejidos debe mantenerse una homeostasis permanente, en el caso del metabolismo óseo existen dos procesos que son fundamentales; la osteoblastogénesis (OBG) y osteoclastogénesis (OCG), los cuales se refieren a la formación y resorción ósea respectivamente. En el primer caso, la formación de osteoblastos (células especializadas relacionadas con el desarrollo y crecimiento del hueso) ocurre a partir de células indiferenciadas (pluripotenciales) gracias a una gran cantidad de señales perfectamente coordinadas entre sí. En este proceso se ha identificado la actividad de varios genes entre ellos: BMP4, BMP7, BMP10, PTH, PTHR, VITD, VDR, SOX4, la familia génica RHO, ESR, IL6, entre otros. Por otro lado, la OCG es también un proceso complejo con gran influencia genética y hormonal con el cual se han relacionado hasta el momento a más de 30 genes diferentes, algunos de los más estudiados son los relacionados con la vía de señalización

RANK/RANK-L/OPG, CSF-1 y la familia génica CPK. Es importante mencionar que RANKL es una proteína que se expresa no solo en los osteoblastos, sino también en sus precursores, su producción es muy alta en las células indiferenciadas del estroma y desciende a medida que se concreta el fenotipo de los osteoblastos. RANK-L (*TNFSF11*) debe interactuar con su receptor natural (RANK), el cual se localiza en la superficie celular de los osteoclastos y sus precursores. RANK, también conocido como receptor del activador del factor nuclear kappa-B (*TNFRSF11A*), este receptor es una proteína transmembranal de 616 residuos de aminoácidos que se expresa en osteoclastos, estimula la fusión de los pre-osteoclastos, promueve la adherencia de los osteoclastos al hueso, activa su función y aumenta su supervivencia al evitar la apoptosis, incrementando así su vida útil, lo que facilita la expansión de la masa osteoclástica para formar así más sitios de resorción ósea. Además de RANK y RANK-L, existe otro elemento fundamental en esta vía de señalización, este elemento es la proteína conocida como osteoprotegerina, la cual presenta la característica de ser soluble y ser sintetizada por los osteoblastos y las células del estroma, ésta proteína funciona como receptor señuelo para impedir la unión RANK- RANK-L, de tal forma que la OPG ejerce un efecto antagónico sobre las acciones RANK-L reduciendo el número de osteoclastos, incrementando así su apoptosis y vida media útil o funcional. Vale la pena mencionar que el avance en el conocimiento de los procesos de osteoblastogénesis, osteoclastogénesis y remodelado óseo representan una oportunidad en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas de la OP postmenopáusica (51-55).

Finalmente, en nuestro país se han realizado ya algunos estudios de asociación en diversos genes con el fin de identificar posibles asociaciones entre variantes génicas y la presencia de OP de columna, cadera o fractura de cadera. Estos trabajos reportan ya posibles asociaciones genotipo-fenotipo, no obstante los resultados se han considerado preliminares y seguramente en poco tiempo podrán ser confirmadas dichas asociaciones, las cuales permitirán diversificar las investigaciones en éste sentido y poder obtener así información que seguramente será de gran impacto en la práctica clínica (23,35).

Justificación:

Actualmente, se considera a la OP como un problema de salud pública internacional y nacional. Esta problemática se acompaña de tasas elevadas de morbimortalidad que representa grandes costos económicos y sociales por lo que se ha considerado una de las prioridades de investigación de nuestro sector salud. En México, como en otros países existe un incremento notable en la esperanza de vida de la población, sobre todo en las últimas cuatro-cinco décadas, sin embargo, esto viene acompañado de una frecuencia mayor de enfermedades crónico-degenerativas como son la osteoporosis y la osteoartritis. Información del Consejo Nacional de Población estima que el número de individuos mayores de 65 años para el año 2050 será de aproximadamente 28 millones. Por estas razones debemos prestar atención a este nuevo panorama epidemiológico y acelerar las investigaciones con impacto en el nuevo conocimiento, el tratamiento y sobre todo la prevención oportuna de este tipo de enfermedades

Por otro lado, a pesar de que la OP se considera un desorden multifactorial y poligénico, la mayoría de las investigaciones nacionales relacionadas con esta entidad muestran orientaciones clínicas, epidemiológicas, y son pocas las investigaciones encaminadas a conocer el componente genético de esta enfermedad en nuestra población. Conocer las variaciones genéticas que presenta nuestra población no solamente nos permitirá con el paso del tiempo y otras investigaciones estructurar un perfil de riesgo genético de osteoporosis en nuestra población. Seguramente, la integración de los nuevos conocimientos nos permitirán dirigir nuestra atención a nuevas investigaciones básicas con utilidad terapéutica y sobre todo preventiva en esta enfermedad.

Pregunta de investigación:

¿Los polimorfismos tipo SNPs rs3018362 y rs12585014 localizados en los genes RANK y RANK-L, respectivamente se encuentran asociados ó no con la presencia de fracturas de cadera en un grupo de mujeres mexicanas con y sin ésta lesión?

Hipótesis:

Es posible que las variantes génicas rs3018362 y rs12585014 si se encuentren asociadas a la presencia de fractura en nuestros grupos de estudio.

Objetivos:

- 1.- Calcular y analizar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs rs3018362 y rs12585014 en los genes *TNFRSF11A* y *TNFSF11* respectivamente, cuyos productos pertenecen al sistema RANK/RANKL/OPG en una muestra representativa de mujeres mexicanas con fractura de cadera (casos) y sin ella (controles)
- 2.- Identificar si existe asociación o no entre las diferentes variantes génicas y la presencia de fractura de cadera en mujeres mexicanas.

Tipo de investigación:

Casos y controles.

Universo de trabajo:

Mujeres mexicanas de 50 años de edad o mayores, procedentes del Instituto Nacional de Rehabilitación. Las pacientes se capturaron en el área de traumatología del instituto.

Grupos de estudio:**Casos:**

Mujeres con fractura de cadera.

Criterios de Inclusión:

- 1.- Mujeres mexicanas mayores de 50 años con antecedente de fractura de esta región anatómica después de esa edad.
- 2.- Que acepten participar en el estudio mediante consentimiento informado (anexo 1).
- 3.- Mujeres que no ingieran fármacos que de alguna u otra forma repercuten sobre la densidad mineral ósea (anticonvulsivantes, corticoesteroides).
- 2.- Mujeres que no presenten enfermedades óseas concomitantes (displasias óseas), desórdenes de tipo hormonal ó metabólico que afectan la densidad mineral ósea.

Criterios de eliminación:

- 1.- Pacientes en quienes no sea posible la realización del 100% de las prácticas moleculares, requeridas para el desarrollo de la investigación.

Controles.**Criterios de Inclusión:**

- 1.- Mujeres mexicanas mayores de 50 años, sin antecedente de fractura de esta región anatómica.
- 2.- Que acepten participar en el estudio mediante consentimiento informado.
- 3.- Mujeres que no ingieran fármacos que de alguna u otra forma repercuten sobre la densidad mineral ósea (anticonvulsivantes, corticoesteroides).
- 2.- Mujeres que no presenten enfermedades óseas concomitantes (displasias óseas), desórdenes de tipo hormonal ó metabólico que afectan la densidad mineral ósea.

Criterios de eliminación:

- 1.- Pacientes en quienes no sea posible la realización del 100% de las prácticas moleculares, requeridas para el desarrollo de la investigación.

Evaluación densitométrica (sólo en controles)

Se determinará por absorciómetro radiológico de doble energía con un equipo (HOLOGIC 2000). Ésta se realizará en cadera (cuello, trocánter, ángulo de Ward y total). Se obtendrán datos de densidad mineral ósea en g/cm^2 .

NOTA: Dado que los casos están representados por mujeres con fractura de cadera recién capturadas en el piso de traumatología y serán ó han sido recientemente intervenidas quirúrgicamente no se realizará la densitometría ósea debido a la gran dificultad para movilizarlas por el trauma reciente ó ante la colocación de la prótesis. Sin embargo, de acuerdo a lo descrito en la literatura ante la presencia de fracturas de cadera se asume la presencia de OP.

Identificación de factores de riesgo:

Se documentaron factores de riesgo relacionados con la salud ósea, para este fin se empleó un formato de recolección de datos de interés en la evaluación de la calidad ósea (anexo 2).

Tamaño de muestra:

Con relación a éstos polimorfismos no existen investigaciones nacionales previas que nos orienten a la estimación aproximada de las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población, aún con relación a otras enfermedades, lo que dificulta contar con los supuestos matemáticos adecuados que se requieren para el cálculo del tamaño de muestra. Es por eso, que esta investigación será considerada como preliminar y contempla sólo el análisis de 85 participantes por grupo (170 alelos y 85 genotipos), posteriormente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa, en una segunda investigación se realizará un cálculo más adecuado.

Variables de estudio:

Dependiente: Presencia o ausencia de la variación genética que caracteriza a los polimorfismos tipo SNPs localizados en los siguientes genes:

TNFRSF11A (RANK) rs3018362. A/G (región 5' del gen)

TNFSF11 (RANKL) rs12585014. A/G (región 5' del gen)

Escala de medición: Nominal dicotómica (presencia o ausencia de la variante)

Independiente: Presencia o ausencia de la fractura de cadera

Fractura de cadera: Pérdida de continuidad en los siguientes sitios:

Cabeza femoral.

Cuello femoral: fractura subcapital o intracapsulares, entre la cabeza y el trocánter mayor.

Intertrocantérica: entre el trocánter mayor y el menor, a lo largo de la línea intertrocantérica.

Subtrocantérica: en el eje largo del fémur inmediatamente debajo del trocánter menor y se puede extender hacia la diáfisis del fémur.

Tipo de variable: Nominal dicotómica (presencia o ausencia de la lesión).

Estudios moleculares para la identificación de los diferentes polimorfismos

Previa extracción de 5-7 ml de sangre venosa periférica de los individuos participantes, se realizó la extracción del DNA genómico mediante la técnica de lisis y precipitación salina que a continuación se resume.

Obtención del DNA Genómico

Se transfirieron 5ml de sangre periférica a un tubo cónico de 15ml y se agregó un volumen igual de amortiguador tris-tritón sacarosa (TTS) agitado por inversión. Se centrifugó a 855 x g, 6min y se decantó el sobranate. Al botón de leucocitos se le agregó 1ml de amortiguador TTS, se agitó y re suspendió el botón para después transferirlo a un microtubo de 1.5ml, el cual se agitó hasta homogenizar. Posteriormente, se centrifugó a 15,633xg, 2min (se repitió 2 a 3 veces el paso 4), al botón limpio se le agregaron 570 μ L de NaCl 5mM, se agitó 2min, se colocaron 30 μ L de SDS al 10% y se agitó nuevamente por 5min. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de NaCl saturado, se agitó 10min y se centrifugó a 13,603xg, 15min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro microtubo limpio y se añadió un volumen de cloroformo:isoamílico 24:1, para después centrifugarlo durante 1min a 13,603xg. Después, se colocó la parte superior (sin tomar la interfase) en un tubo de 13x100mm estéril, se agregaron 2ml de etanol absoluto a -20°C, para precipitar el DNA y se agitó el tubo lentamente en forma circular para después precipitarlo durante 12 hs a -20°C. Posteriormente, se tomó el DNA con una varilla de vidrio y se lavó con etanol frío al 70%, se dejó evaporar el etanol en condiciones de esterilidad, posteriormente se resuspendió el DNA con agua estéril de acuerdo con el tamaño del botón. Finalmente, se colocó el tubo que contenía el DNA en baño María a 60°C durante 2hrs y posteriormente se guardó a -70°C hasta su uso.

Posteriormente, se llevó a cabo la discriminación alélica mediante PCR tiempo real en un equipo Step One Real Time PCR System de 48 pozos (Applied Biosystems [A&B]Foster city, CA. USA) utilizando 25 μ l del PCR mix que contenía 1XTaqMan PCR master mix, sondas Taq Man marcadas con fluorescencia con VIC o FAM de acuerdo a las condiciones de fabricante (AppliedBiosystems) y 12.5 ng de DNA genómico. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización por 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 15 s a 92 °C y 1 min a 60 °C.

Resultados

Aspectos clínicos:

Ambos grupos de estudio estuvieron conformados por 85 participantes cada uno. En el grupo de los casos la media de edad fue de 78.93 años con un recorrido entre 50-105 de años, mientras que la media de edad del grupo de los controles fue de 62.8 años con un recorrido entre 50-82 años, en la tabla 4 se muestra la distribución de las edades por décadas y quinquenios y en la tabla 5 se concentran la media de edad por grupo de estudio así como el peso y el índice de masa corporal promedio en cada grupo.

Tabla 4.- Rango de edad de los casos y controles por décadas y quinquenios.

Rango de edad por décadas	Fractura de cadera	Controles	Rango de edad por quinquenios	Fractura de cadera	Controles	Promedio de edad. Casos (por rango)	Promedio de edad. Controles (por rango)
50's	3	37	50-54	1	10	50	52
60's	9	32	55-59	2	27	56.5	56.6
70's	33	12	60-64	3	15	61.3	62.2
80's	30	4	65-69	6	17	67	67.3
90's	9		70-74	12	8	72.6	72.2
100's	1		75-79	21	4	77.2	77.2
			80-84	14	4	81.5	81
			85-89	16		86.9	
			90-94	7		91.1	
			95-99	2		95.5	
			100-104	1		105	

Tabla 5.- Rango de edad de los casos y controles por décadas y quinquenios.

	Casos	Controles
Promedio de edad	78.93	62.8
Edad mínima	50	50
Edad máxima	105	82
Peso promedio (kg)	58.49	68.34
Promedio de índice de masa corporal	1.52	1.54

Es importante mencionar que en la génesis de la osteoporosis existen varios factores de riesgo mayores y menores que se consideran de relevancia para la salud ósea y como consecuencia para la presencia de OP, algunos de estos factores son “no modificables”, entre ellos se encuentran además del género, la edad y la historia personal y familiar de fracturas, mientras que entre los factores modificables destacan el peso, talla, índice de masa corporal, consumo de alcohol y tabaco, ingesta de estrógenos, glucocorticoides u otros fármacos con repercusión sobre el fenotipo óseo, todos estos factores de riesgo, representan variables con efecto potencialmente confusor. El análisis de algunos de estos datos en nuestros grupos de estudio se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Factores de riesgo relacionados con la presencia de osteoporosis.

Variable	Casos	Controles
Historia personal de fracturas	29	5
Historia familiar de fracturas	12	24

Como podemos apreciar en la tabla 6, las fracturas previas tanto de los casos como de los controles ocurrieron sobre todo en; cadera contralateral (casos), radio distal, fémur y ocasionalmente tobillo y clavícula, cabe señalar que los antecedentes fractura que se investigaron comprendió sólo a los padres y hermanos.

Aspectos moleculares:

Las frecuencias alélicas y genotípicas de cada variante génica se concentran en la tabla 7.

Tabla 7.- Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos de estudio.

SNP	Casos		Comparación de frecuencias casos vs controles	Controles		Comparación de frecuencias casos vs controles
	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	
RANK rs3018362	A 41.76% (N=71) G 58.24% (N=99)	AA 11.76% (N=10) AG 60% (N=51) GG 28.24 % (N=24)	A vs G Chi ² 0.11 Valor de P 0.74 OR (IC 95%) 0.93 (0.59- 1.46)	A 43.53% (N=74) G 56.47% (N=96)	AA 16.47% (N=14) AG 54.12% (N=46) GG 29.41% (N=25)	AA vs AG +GC Chi ² 0.78 Valor de P 0.37 OR (IC 95%) 0.68 (0.26- 1.75) AA +AG vs GG Chi ² 0.03 Valor de P 0.86 OR (IC 95%) 1.06 (0.52- 2.17)
RANKL rs12585014	A 40.59% (N=69) G 59.41% (N=101)	AA 21.18% (N=18) AG 38.82% (N=33) GG 40% (N=34)	A vs G Chi ² 0.01 Valor de P 0.791 OR (IC 95%) 0.98 (0.62- 1.54)	A 41.18% (N=70) G 58.82% (N=100)	AA 20% (N=17) AG 42.35% (N=36) GG 37.65% (N=32)	AA vs AG +GG Chi ² 0.04 Valor de P 0.84 OR (IC 95%) 1.07 (0.48- 2.41) AA +AG vs GG Chi ² 0.01 Valor de P 0.75 OR (IC 95%) 0.91 (0.47- 1.76)

Discusión

La osteoporosis primaria representa en la actualidad uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo, se trata de una entidad con una evolución crónica y degenerativa y dado el aumento en la esperanza de vida de las poblaciones en general, se espera un incremento en su frecuencia.

En su etiopatogenia se ven implicados diferentes factores “no modificables” y “modificables”, entre los primeros encontramos al género, la edad y a los factores genéticos, mientras que los segundos comprenden una gran cantidad de factores susceptible de modificación, éstos son de tipo ambiental y guardan gran relación con el estilo de vida (características de la alimentación, actividad física, consumo de café, alcohol, etc.).

Desde hace varias décadas, múltiples y variadas investigaciones han explorado la magnitud del componente genético de la OP, para este fin se han desarrollado estudios de concordancia en gemelos, de adopción, de factores de riesgo en poblaciones cautivas, análisis de ligamiento y más recientemente estudios de asociación genética entre polimorfismos y el rasgo fenotípico de interés. En el caso de la OP, el análisis integral de los resultados de las investigaciones sugieren que la heredabilidad de la DMO en general oscila entre el 40-70% en columna, entre 70-85% en cadera y en muñeca entre 50-60%. Estudios densitométricos en gemelos monocigotos (MC) y dicigotos (DC) han revelado que la concordancia de la DMO de columna vertebral y cuello femoral es mayor (6-8:1) en gemelos MC que en gemelos DC. En este mismo sentido, se ha estimado que la heredabilidad de las fracturas por sí misma oscila entre 25-35%. Los análisis familiares son otro tipo de investigaciones que han aportado datos interesantes, se ha reportado historia familiar de fracturas osteoporóticas hasta en el 40% de los pacientes con fracturas relacionadas con OP. Es importante mencionar que la historia personal y familiar de fracturas representa uno de los factores de riesgo mayores en esta enfermedad así como en el riesgo de ocurrencia de fracturas.

Sin duda, la complicación más común y costosa de la OP son las fracturas, las más frecuentes son las de columna vertebral y radio distal, sin embargo, las de cadera son más aparatosas, dolorosas, costosas y generan una gran discapacidad. Sus costos

familiares, sociales, laborales y económicos para el sector salud son muy altos y cabe mencionar que un buen número de pacientes que las presentan, aún y cuando son operados y rehabilitados no recuperan ya el estilo de vida y capacidades previas a la fractura.

Indudablemente el fenotipo óseo se encuentra bajo una gran influencia de los factores genéticos, de hecho, la cantidad de genes implicados en el control genético de la DMO es considerable, entre ellos tenemos aquellos que codifican para proteínas estructurales, factores de crecimiento importantes para el hueso, sus receptores, hormonas y sus receptores, genes específicos de osteoblastogénesis y osteoclastogénesis, incluso genes relacionados con cáncer, entre otros (tabla 3).

El grupo de investigación en el cual se desarrolló esta tesis ha explorado ya la frecuencia de varios polimorfismos con relación a la presencia de OP de columna vertebral y cadera principalmente, algunos de los resultados han mostrado y sugerido ya algunas asociaciones, en este caso se ha buscado iniciar el análisis en otros genes, particularmente RANK y RANK-L con el fin de identificar nuevas asociaciones. El motivo por el cual se seleccionaron éstos genes es que sabemos que la vía de señalización RANK/RANK-L/OPG es fundamental en la remodelación y resorción del tejido óseo y que los estudios de asociación entre variaciones en estos genes y OP y fracturas por OP son escasos. Esta investigación preliminar comprendió el estudio de 170 mujeres mexicanas mayores de 50 años, 85 con fractura de cadera después de los 50 años y el resto sin antecedente de ésta lesión.

Como podemos apreciar en las tablas 4 y 5 el promedio de edad en ambos grupos es diferente, siendo de casi 79 años en los casos contra 62 de los controles, en este sentido debemos señalar que durante el desarrollo de esta y otras investigaciones el grupo de investigación enfrenta la problemática de reclutar controles, dado que la osteoporosis es una enfermedad crónico-degenerativa, en nuestro medio es verdaderamente difícil encontrar adultos mayores con una buena calidad ósea que les permita representar un control “sano”. En este mismo sentido, hemos detectado que la osteoporosis y su complicación más aparatosa que son las fracturas en la actualidad se presentan en población cada vez más joven. En éste sentido, conscientes de tal problemática

prolongaremos la investigación con la intención de recabar un número mayor de controles y estar en condición de analizar dos controles por caso.

Con lo que respecta a la historia personal y familiar de fracturas, como podemos apreciar en la tabla 6 los antecedentes de fractura están presentes en ambos grupos, siendo la historia personal más común en los casos y la familiar en los controles, ambas condiciones se consideran un factor de riesgo mayor para osteoporosis y para el riesgo de fractura, es importante mencionar que la fractura previa más común en los casos es la fractura de radio distal, en este sentido es muy importante mencionar que si bien no está documentado como tal en la literatura científica la experiencia de los cirujanos de mano considera que las fracturas de radio distal “anuncian” de alguna manera a las fracturas de cadera en poco tiempo. En este sentido una nueva investigación con la estructura metodológica requerida será seguramente de gran información.

Con el fin de investigar la asociación fenotipo-.genotipo ya señalada se diseñó un estudio de asociación genética entre casos y controles, en el que mediante PCR en tiempo real se identificaron los alelos y genotipos de cada variante.

El resultado de ésta investigación revela que al menos en ésta muestra de participantes no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias alélicas de los casos vs los controles, de igual manera, podemos apreciar que tampoco el análisis genotípico realizado en el contraste de grupos muestra diferencias con significado estadístico (tabla 7).

Ante estos hallazgos es importante mencionar que definitivamente es indispensable analizar un número mayor de participantes para confirmar la ausencia de asociación entre las variantes génicas investigadas y la presencia de fractura de cadera. En este caso, los dos polimorfismos seleccionados para la realización de este estudio representan sólo dos de los polimorfismos identificados en los genes RANK y RANK-L, existen además de estos, otros más que sería interesante analizar para poder estar en posibilidades de realizar un análisis más extenso, incluso un análisis mediante haplotipos.

Es importante señalar que aún y cuando el tamaño de los grupos de estudio es pequeño si esperábamos encontrar alguna asociación, dado que se trata de variaciones en dos de los genes más importantes en el metabolismo óseo, particularmente en el proceso de osteoclastogénesis, de hecho, uno de ellos (rs3018362) había sido estudiado en otras poblaciones (mujeres de Eslovenia, Islandia y otras más de ascendencia europea), los resultados de éstas investigaciones se presentan en la tabla 8.

Tabla 8.- Estudios de asociación entre variaciones en los genes RANK y RANK-L en diversas poblaciones (56-62).

GEN	POLIMORFISMO	UBICACIÓN	OBSERVACIÓN
RANKL	C/T	Intrón 1	Asociado con disminución de la DMO de cadera en familias europeas. Asociado con baja DMO de columna en mujeres osteoporóticas de Eslovenia. El genotipo CC asociado con una DMO baja en mujeres post-menopáusicas de Eslovenia. Asociados con disminución de la DMO columna en mujeres post-menopáusicas de Eslovenia.
RANKL	C/T	Intrón 2	Asociado con disminución de la DMO de cadera en familias europeas.
	C/T	Intrón 1	El genotipo CC asociado con una baja DMO en cadera y columna de mujeres posmenopáusicas de Eslovenia. Asociado con baja DMO en columna en mujeres posmenopáusicas de Eslovenia.
	C/G	Intrón 1	Asociado con un disminución de la DMO columna en mujeres posmenopáusicas de Eslovenia.
	C/T	rs9594738	Asociado con baja DMO de columna, asociados moderadamente con fracturas, en sujetos australianos, daneses e islandeses.
	C/T	rs9594759	
RANK		rs3018362	Asociado con baja DMO cortical. Analizado en mujeres de Reino Unido (ALSPAC) y varones suecos (GOOD). Asociado con baja DMO en cadera de Islandeses y sujetos de descendencia Europea.
	A/G	Intrón 1	Los 17 polimorfismos analizados como haplotipos, mostraron asociación con OP y disminución de la DMO de cadera y columna, en familias europeas.
	A/G	Intrón 1	
	A/C	Intrón 1	
	C/G	Intrón 1	
	A/G	Intrón 1	
	A/G	Intrón 2	
	A/T	Intrón 3	
	G/T	Intrón 3	
	A/T	Intrón 4	
	C/T	Intrón 7	
	A/G	Intrón 7	
	G/T	Intrón 9	
	G/T	Intrón 9	
	C/T	Intrón 9	
	C/G	Intrón 9	
	G/T	Región 3'	
	C/T	Región 3'	
	A/G	Intrón 6	Polimorfismo asociado con baja DMO en triángulo de Ward, trocánter y fémur, en coreanos.

Sin duda, la cantidad de genes que participan de alguna u otra manera en el metabolismo óseo es grande, motivo por el cual se considera que la osteoporosis es una entidad multifactorial y poligénica. Sabemos ya que el análisis del componente genético de las enfermedades complejas es difícil y debe abordarse desde diferentes puntos de vista, de hecho, existen diferentes opciones, entre las que se encuentran los estudios en gemelos, de adopción, de poblaciones cautivas, de ligamiento y en las últimas décadas los estudios de asociación. En ellos se investiga la asociación entre variantes génicas y rasgos fenotípicos, como es en éste caso la presencia de fracturas de cadera, sin embargo, en estas investigaciones el proceso de selección de los casos y los controles debe ser cuidadoso con el fin de obtener grupos de contraste los más homogéneos posible. Por otro lado, el análisis debe contemplar la ancestría genética de los participantes, ya que es posible encontrar heterogeneidad poblacional capaz de generar asociaciones espurias, y por último cabe resaltar la importancia de documentar en los casos y en los controles variables sobre todo ambientales capaces de ejercer un efecto potencialmente confusor en los resultados y que conduzca a establecer falsas asociaciones.

Vale la pena mencionar, que la obtención de controles (sujetos sin el rasgo fenotípico de interés) para esta investigación así como en cualquier investigación relacionada con enfermedades crónico degenerativas es verdaderamente difícil, ya que encontrar adultos mayores en condiciones de salud que les permita representar a un individuo control es cada vez más complicado por diferentes razones, una de ellas es que a mayor edad, mayor es la posibilidad de que existan y coexistan enfermedades crónico degenerativas, y por otro lado el actual estilo de vida favorece la exposición a factores de riesgo de tipo ambiental (alimentación, actividad física, etc.), es por eso que el análisis multivariado en estas investigaciones resulta de gran utilidad.

Finalmente, ciertamente la magnitud de la susceptibilidad genética de los individuos, las familias y los grupos poblacionales con relación a una enfermedad es una condición “no modificable”, conocer sus características y comportamiento podrá proporcionarnos información con relación a la estructura genética de las poblaciones con respecto a una enfermedad en particular, esto aunado a otras estrategias podría ser un elemento de análisis para el diseño de nuevas estrategias preventivas mediante la detección oportuna de individuos con riesgos altos para alguna (s) enfermedad (es), es posible incluso que

las investigaciones en el campo de la genómica resulten en la disponibilidad de nuevas opciones terapéuticas no solo en osteoporosis sino con otras entidades relacionadas con metabolismo óseo, esto será particularmente importante si consideramos que varias de las enfermedades crónico degenerativas como la OP se presentan actualmente en población cada vez más joven debido sobre todo al estilo de vida que prevalece en la vida moderna.

Referencias

- 1.- NIH Consensus Development Panel On osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy . Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001; 285:785-95.
- 2.- Asociación mexicana de metabolismo óseo y mineral. Consenso Mexicano de osteoporosis. *Rev Invest Clin*. 2001; 53:469-95.
- 3.- World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report series 843 Genova: World Health Organization: 1994.
- 4.- Zoe A. Cole, Elaine M, Dennison, and Cyrus Cooper. Osteoporosis Epidemiology Update. *Curr Rheumatol Rep*. 2008; Apr; 10 (2): 92-6.
- 5.- Clark P, Cons-Molina F, Delezé M, et al. The Prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries. The Latin American Vertebral Osteoporosis. Study (LAVOS). *Osteoporos Int*. 2009; 20:275-82.
- 6.- Clark P, Cons-Molina F, Delezé M, et al. The Prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries. The Latin American Vertebral Osteoporosis. Study (LAVOS). *Osteoporos Int*. 2009; 20:275-82.
- 7.- Ismail AA, T W ONeill, Cooper C, Felsenberg D, Varlow J, Kanis JA, Silman AJ, ONeill TW. Number and type of Vertebral Deformities Epidemiological Characteristics and relation to back pain and height loss. *Osteoporos Int*. 1999; 9(3):206-13.
- 8.- Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1994; 9:1137–1141. [[PubMed](#)]].
- 9.- Elliot V, Bogoch ER, Jamal SA, Beaton DE. Practice patterns in the diagnosis and treatment of osteoporosis after a fragility fracture: a systematic review. *Osteoporos Int*. 2004; 15:767-78.
- 10.- Ferrari S. Human genetics of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22:723–735.
- 11.- Stuart H. Ralston and Benoit de Crombrughe. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev*. 2006; 20: 2492-2506.
- 12.- Williams FM, Spector TD. Recent advances in the genetics of osteoporosis. *J Musculoskelet*. 2006; Jan-Mar; 6(1): 27-35.
- 13.- Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes and Dev*. 2006; 20:2492-2506.
- 14.- Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2460–2466. doi: 10.1210/jc.87.6.2460. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)].
- 15.- Slemenda CW, Tuner CH. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporosis Int*. 2000; 6: 178-82.
- 16.- Arden NK, Baker J, Hogg C. The heredability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study postmenopausal twins. *J. Bone. Miner. Res*. 1996; 11:530-34.
- 17.- Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of growth in ob/ob mice. *Regulatory Peptides*. 2000; 92:1-3,73-8.
- 18.- Jie-mei GU, Wen-Jin XIAO, Jin-Wei HE, Hao ZHANG Wei-wei HU, Yun-qiu HU, Miao LI, Yu-juan LIU, Wen-zhen FU, Jin-bo YU, Gao GAO, Hua YUE, Yao-hua KE, Zhen-lin ZHANG. Association between VDR and ESR1 gene polymorphisms with bone and obesity phenotypes in Chinese male nuclear families. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009; 30:1634-1642.
- 19.- Francesca Mariani and Maria Luisa Brandi. Genetic Determinant of osteoporosis: Common Bases to Cardiovascular Diseases?. *International Journal of Hipertention*. 2010 Mar 25: pii 394579.
- 20.- Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res*. 2006 Nov; 21(11):1678-95.

21. Ongphiphadhanakul B, Chanprasertyothin S, Payattikul P, Saetung S, Piaseu N, Chailurkit L, Rajatanavin R. Association of a G2014A transition in exon 8 of the estrogen receptor- α gene with postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2001 Dec; 12(12):1015-9.
22. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, Sañudo C, Mijares V, González-Macías J. A gene-to-gene interaction between aromatase and estrogen receptors influences bone mineral density. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jul; 155(1):53-9.
23. Gómez R, Magaña JJ, Cisneros B, Pérez-Salazar E, Faugeron S, Véliz D, Castro C, Rubio J, Casas L, Valdés-Flores M. Association of the estrogen receptor α gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population. *Clin Genet*. 2007 Dec; 72(6):574-81.
24. Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, Piaseu N, Chailurkit L. Serum oestradiol and oestrogen-receptor gene polymorphism are associated with bone mineral density independently of serum testosterone in normal males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998 Dec; 49(6):803.
25. 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 Nov; 43(5):910-14.
26. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM and D Karasik Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Medical Genetics*. 2007; 8 (supl I):S14.
27. Greendale GA, Chu J, Ferrell R, Randolph JF Jr, Johnston JM, Sowers MR. The association of bone mineral density with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med*. 2006 Sep; 119(9 Suppl 1):S79-86.
28. Massart F, Marini F, Bianchi G, Minisola S, Luisetto G, Pirazzoli A, Salvi S, Micheli D, Masi L, Brandi ML. Age-specific effects of estrogen receptors' polymorphisms on the bone traits in healthy fertile women: the BONTURNO study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Apr; 22; 7:32.
29. Limer KL, Pye SR, Thomson W, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Huhtaniemi IT, Adams JE, Ward KA, Platt H, Payne D, John SL, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Wu FC, O'Neill TW; EMAS Study Group. Genetic variation in sex hormone genes influences heel ultrasound parameters in middle-aged and elderly men: results from the European Male Aging Study (EMAS). *J Bone Miner Res*. 2009 Feb; 24(2):314-23.
30. Rivadeneira F, van Meurs JB, Kant J, Zillikens MC, Stolk L, Beck TJ, Arp P, Schuit SC, Hofman A, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2006 Sep; 21(9):1443-56.
31. Shearman AM, Karasik D, Gruenthal KM, Demissie S, Cupples LA, Housman DE, Kiel DP. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J Bone Miner Res*. 2004 May; 19(5):773-81.
32. Ichikawa S, Koller DL, Peacock M, Johnson ML, Lai D, Hui SL, Johnston CC, Foroud TM, Econs MJ. Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Nov; 90(11):5921-
33. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *J Hum Genet*. 2003; 48(5):243-8.
34. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet*. 2001; 46(5):267-72.
35. Magaña JJ, Gómez R, Cisneros B, Casas L, Valdés-Flores M. Association of interleukin-6 gene polymorphisms with bone mineral density in Mexican women. *Arch Med Res*. 2008 Aug; 39(6):618-24.
36. Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Cáceres E, Blanch J, Carreras R, Díez-Pérez A, Grinberg D, Balcells S. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor

gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. *Eur J Endocrinol.* 2007 Nov; 157(5):677-84.

37. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnerio P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan; 88(1):255-59.

38. Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, Cáceres E, Carreras R, Mellibovsky L, Balcels S, Díez-Pérez A, Grinberg D. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007 Feb; 18(2):235-43.

39. Morrison N. Commentary: vitamin D receptor polymorphism and bone mineral density: effect size in Caucasians means detection is uncertain in small studies. *Int J Epidemiol.* 2004 Oct; 33(5):989-94.

40. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Ialpha1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb; 16(2):379-85.

41. Pérez A, Ulla M, García B, Lavezzo M, Elías E, Binci M, Rivoira M, Centeno V, Alisio A and Tolosa de Talamoni N. Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26:358-65.

42. Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G and Cummings SR. Association of the VDR translation start site polymorphism and fracture risk in older women *J Bone Mineral Res.* 2007; 22(5):730-36.

43. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Teskac K, Ostanek B, Smelcer M and Marc J. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *J Mol Endocrinology.* 2009; 42:239-47.

44. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, Sañudo C, Hernández JL, Amado JA, Zarrabeitia A, González-Macías J. Aromatase gene and osteoporosis: relationship of ten polymorphic loci with bone mineral density. *Bone.* 2005 May; 36(5):917-25.

45. Mendoza N, Morón FJ, Vázquez F, Quereda F, Sáez ME, Martínez-Astorquiza T, González-Pérez A, Sánchez-Borrego R, Ruiz A. Weighting the effect of CYP19A gene in bone mineral density of postmenopausal women. *Bone.* 2006 Jun; 38(6):951-53.

46. Riancho JA, Valero C, Naranjo A, Morales DJ, Sañudo C, Zarrabeitia MT. Identification of an aromatase haplotype that is associated with gene expression and postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb; 92(2):660-65.

47. Riancho JA, Sañudo C, Valero C, Pipaón C, Olmos JM, Mijares V, Fernández-Luna JL, Zarrabeitia MT. Association of the aromatase gene alleles with BMD: epidemiological and functional evidence. *J Bone Miner Res.* 2009 Oct; 24(10):1709-18.

48. Hong X, Hsu YH, Terwedow H, Arguelles LM, Tang G, Liu X, Zhang S, Xu X, Xu X. CYP19A1 polymorphisms are associated with bone mineral density in Chinese men. *Hum Genet.* 2007 May; 121(3-4):491-500.

49. Vilariño-Güell C, Miles LJ, Duncan EL, Ralston SH, Compston JE, Cooper C, Langdahl BL, Maclelland A, Pols HA, Reid DM, Uitterlinden AG, Steer CD, Tobias JH, Wass JA, Brown MA. PTHR1 polymorphisms influence BMD variation through effects on the growing skeleton. *Calcif Tissue Int.* 2007 Oct; 81(4):270-78.

50. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. 2008 Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 371:1505-12.

51. Paternoster L, Ohlsson C, Sayers A, Vandenput L, Lorentzon M, Evans DM, Tobias JH. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and

- gothenburg osteoporosis and obesity determinants cohorts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug; 95(8):3940-8.
52. 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 Mar; 40(3):219-24.
53. Kim JG, Kim JH, Lee DO, Kim H, Kim JY, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Changes in the serum levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator for nuclear factor kappaB ligand after estrogen-progestogen therapy and their relationships with changes in bone mass in postmenopausal women. *Menopause.* 2008; Mar-Apr;15(2):357-62.
54. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2010 Jan; 37(1):227-34.
55. Geng L, Yao ZW, Luo JY, Han LL, Lu Q. Association between Val80 polymorphism of the CYP19 gene, A163G polymorphism of the OPG gene and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Yi Chuan.* 2007 Nov; 29(11):1345-50.
56. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med.* 2008 May 29; 358(22):2355-65.
57. Mencej S, Prezelj J, Kocijancic A, Ostanek B, Marc J. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas.* 2006 Oct 20; 55(3):219-26.
58. Mencej S, Albagha OM, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Mol Endocrinol.* 2008 Jun; 40(6):273-79.
59. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Snorraddottir S, Center JR, Nguyen TV, Alexandersen P, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet.* 2009. 41:15-17.
60. Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007 Mar; 18(3):323-31.
61. Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res.* 2006 Nov; 21(11):1678-95.
62. Paternoster L, Ohlsson C, Sayers A, Vandenput L, Lorentzon M, Evans DM, Tobias JH. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and gothenburg osteoporosis and obesity determinants cohorts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug; 95(8):3940-8.

Anexo 1

Consentimiento informado:

A través de la presente expreso mi autorización voluntaria para participar en el proyecto de investigación intitulado “Polimorfismos génicos relacionados con fracturas de cadera en población mexicana”, registrado en la Comisión de Investigación del Instituto con el número de registro CONACYT-SALUD C01 -69706 y a cargo de la Dra. Margarita Valdés Flores, quien es Investigador y Médico Adscrito al Servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación. Mi autorización consiste en lo siguiente: Se me practicará una evaluación de la densidad mineral ósea de cadera y/o columna vertebral a través de una densitometría ósea, la cual es considerada un método diagnóstico confiable y no invasivo. Se me realizará además la toma de una muestra de sangre venosa periférica (5-7 ml), comprendo que representa un riesgo mínimo por lo que otorgo mi consentimiento. Esto se realizará con el propósito de extraer una muestra de mi DNA genómico total. Esta muestra formará parte de un banco de DNA que será resguardado en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación. Así mismo acepto que esta muestra de DNA sea utilizada para la realización de estudios moleculares de investigación relacionados con el estudio de polimorfismos génicos (características genéticas) relacionados con enfermedades poligénicas y multifactoriales como es la osteoporosis y que son comunes en la población mexicana.

Me ha sido proporcionada una explicación clara de la importancia de conocer las características genéticas de la población mexicana, lo cual, entre otras cosas permitirá que a través de diferentes investigaciones pueda conocerse en forma más precisa el grado de susceptibilidad genética que nuestra población y en particular algunas familias presentan con relación a enfermedades que representan grandes problemas de salud en nuestro país y en el mundo, como son la obesidad, osteoporosis, artritis, hipertensión, diabetes, cáncer, etc. Queda entendido que acepto que los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados en revistas de difusión científica y de momento no tienen utilidad en la asistencia médica.

Reitero mi deseo de participar voluntariamente para la formación de este banco de DNA y acepto el uso en investigación médica que se dará a mi muestra de DNA. Por mi participación no recibiré beneficio económico ni de ningún otro tipo y se me ha informado que el declinar la invitación de participación no afectará la calidad de atención que recibo en el instituto.

Por otra parte, acepto proporcionar la siguiente información personal:

Confirmando que al menos las tres últimas generaciones de mi familia han vivido en esta área geográfica (especificar sitio de origen y residencia actual).

Lugar de origen del donador de la muestra	
Lugar de residencia del donador de la muestra	
Lugar de origen del padre	
Lugar de origen de la madre	
Lugar de origen del abuelo paterno	
Lugar de origen de la abuela paterna	
Lugar de origen del abuelo materno	
Lugar de origen de la abuela materna	

Nombre y firma del voluntario:

Domicilio _____

Teléfono (s) _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Anexo 2.-

Formato de recolección de datos usado de forma general por la línea de investigación “Análisis de polimorfismos génicos relacionados con osteoporosis en población mexicana”

Número de Registro hospitalario: _____

Día

Mes

Año

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

Sexo

Edad actual _____ Peso actual _____ Talla actual _____ I M C _____

Antecedente familiar de fractura de cadera, columna, muñeca u otros sitios. Especificar sitio de fractura y grado de parentesco.

Antecedente personal de fractura de cadera, columna, muñeca u otro sitio anatómico. Especificar mecanismo de fractura y edad de presentación de la fractura.

Tabaquismo activo

Fecha de inicio de tabaquismo. Especificar número de cigarrillos al día.

Administración de corticoides a dosis mayores de 7.0 mg/día (prednisona o equivalente por más de tres meses). _____

Reemplazo hormonal: No _____ Si _____ Duración: _____

Responsable de la aplicación del cuestionario: _____

Fecha actual: _____