



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO POLIMÓRFICO DEL GEN  
DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO  
BETA Y SU RELACIÓN CON LA  
DENSIDAD MINERAL ÓSEA  
MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUIMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**  
**JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ENERO, 2004





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.

**Jurado Asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>IRMA OFELIA BERNAL LUGO</b>
<b>Vocal</b>	<b>TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES</b>
<b>Secretario</b>	<b>MA. DEL ROCÍO GÓMEZ ORTEGA</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>ROSALINDA VELÁZQUEZ SALGADO</b>
<b>2do. Suplente</b>	<b>MA. BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO</b>

**Lugar donde se desarrolló el tema:**



**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, TORRE DE  
INVESTIGACIONES CENTRO NACIONAL DE  
REHABILITACIÓN**

**Asesor: M. en C. Ma. Del Rocío Gómez Ortega**



**Supervisor Técnico: Dr. en C. Margarita Valdés Flores**



**Sustentante: Jonathan Javier Magaña Aguirre**



La osteoporosis (OP) es una enfermedad esquelética sistémica multifactorial caracterizada por la disminución de la masa ósea y el deterioro microestructural del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad del hueso y de la susceptibilidad para el desarrollo de fracturas, padecimiento que en la actualidad es un problema importante de salud pública a nivel mundial.

Los estrógenos y sus receptores juegan un papel importante en el metabolismo óseo, los cuales pueden tener una correlación importante como marcador de la pérdida de densidad mineral ósea (DMO).

El gen del receptor de estrógeno beta ( $ESR\beta$ ) presenta secuencias altamente polimórficas del tipo de repetición en tándem o también llamadas microsatélite (STR), los cuales constituyen una herramienta muy valiosa para el diagnóstico temprano de muchas enfermedades. Estos marcadores constituyen una importante herramienta para el diagnóstico molecular ya que permiten asociar alelos característicos a padecimientos específicos, además que la nueva tecnología permite realizarlo de forma rápida y con un alto nivel de precisión.

En este trabajo se realizó el estudio de genética de población del polimorfismo dinucleótido (citosina-adenina; CA), localizado en la región del gen del  $ESR\beta$ , delimitada en la región q23-24.1 del cromosoma 14, para un grupo de 150 voluntarios mexicanos (300 alelos). Se realizó el estudio en un grupo de 29 mujeres mexicanas con osteopenia (58 alelos), en un grupo de 29 mujeres mexicanas que presentaron OP (58 alelos), así como en 29 mujeres controles (58 alelos), para ello, se empleó la amplificación *in vitro* de segmentos específicos del gen del  $ESR\beta$  mediante la técnica de PCR y por medio de electroforesis capilar (CE) se determinaron los alelos característicos de la población. Así mismo, se investigó la relación entre este polimorfismo y la pérdida de DMO en el grupo de mujeres mexicanas con osteopenia y en el grupo de mujeres con OP, en comparación del grupo control, a través de estudios densitométricos de cadera y columna, usando absorciometría de rayos X de doble nivel de energía (DEXA, densitómetro) con el fin de predecir la susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad, y con ello prevenir o prolongar su desarrollo a través de ejercicio y dietas específicas.

Los alelos fueron clasificados a partir de A-- hasta el alelo S de acuerdo al número de repetidas, que van de 16 a 38 respectivamente. La DMO fue expresada en pDMO (porcentaje de pérdida de DMO) y

---

en Z score (unidades de desviación estándar en relación peso-ajustado a la DMO de cada edad). Se encontró que el genotipo GH se encuentra relacionado con la pérdida de DMO, ya que tiene diferencias significativas de 0.045 en comparación a su presencia en la población control, teniendo una pérdida de DMO promedio del 39% y una presencia del 22% en los casos estudiados con OP. El genotipo EF muestra diferencias significativas de 0.0051 con respecto al control, aunque la incidencia de este último no es tan alta con respecto a los casos encontrados.

Estos resultados sugieren que la variación genética del locus ESR $\beta$  puede ser asociada con algunos determinantes de DMO, y posiblemente sus polimorfismos podrían estar involucrados en el desarrollo de OP, aunados a problemas presentes en otros genes.

## DEDICATORIAS:

*El mayor de los agradecimientos a esas personas especiales que representan, parte de mi vida.*

*A mis Padres y Hermano, por estos 23 años, por ser una verdadera familia, por su gran amor, apoyo, cariño, paciencia, confianza y comprensión, gracias a ustedes por llevarme de la mano y convertirme en lo que soy ahora. Gran parte de este triunfo, también es de ustedes.*

*A Marcela por compartir esta etapa de mi vida, gracias a su Amor que es algo muy difícil de encontrar y es algo que me hace sentir muy orgulloso. Gracias a todos esos momentos especiales, Te Amo.*

*A Gabriel, Edgar y Jorge, por ser más que amigos, por ser mis "hermanos", a los que llevo siempre muy presente, con los que siempre estaré en las buenas o en las malas.*

*A Rafa por ser el gran amigo que todos quieren, por esas horas de alegre compañía y por siempre estar a mi lado, hasta en las mayores locuras.*

*A mis Amigos: L. Ramón, Fer, Miriam, Fabiola, Ross, Tere, Sonia, Chava, Belí, por su cariño y amistad en todo momento en las diferentes etapas de mi vida, gracias.*

*A todos aquellos que ya no están conmigo, pero que desde donde estén puedan estar orgullosos.*

## AGRADECIMIENTOS.

*Mi sincero agradecimiento a los profesores e instituciones que proporcionaron su apoyo a lo largo de mi formación académica y que contribuyeron a la realización de este trabajo.*

*A mi queridísima Universidad Nacional Autónoma de México, no solo por una formación académica, si no también, por ser un instituto de vida, así como un segundo hogar.*

*A la facultad de Química, a quien debo mi formación académica y profesional, al igual que grandes momentos que marcaron mi vida.*

*A la M. en C. Rocío Gómez, por su acertada dirección, su tiempo, apoyo y experiencia transmitida en esta investigación, por su dedicación y sobretodo su amistad transmitida de manera incondicional.*

*A la Dra. en C. Margarita Valdés, por la confianza, por todas las facilidades y por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, así como el conocimiento transmitido.*

*A la Dra. en C. Leonora Casas, por siempre mostrar su apoyo, tanto en el trabajo como en lo personal, además de hacerme más llevadera la estancia en el laboratorio.*

*Al Centro Nacional de Rehabilitación, a sus instalaciones, en donde pude desarrollar este trabajo y conocer a gente tan agradable.*

*A la Dra. Irma Bernal, M. en C. Teresa de Jesús Olivera, QFB. Rosalinda Velázquez, M en C. Ma. Benita Leonor Fernández por las revisiones y comentarios de este trabajo.*

*En especial al Profr. Manuel Murguía, quien me encauzó en este camino de las ciencias y destacaba siempre por sus sabios consejos y la responsabilidad que de cierta forma han logrado que me encuentre aquí.*

*A mis Maestros que me enseñaron ideales, experiencias y conocimientos.*

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
2.1 ¿Qué es la Osteoporosis	3
2.2 Fisiología del Hueso	7
2.2.1 Modelación y remodelación ósea	8
2.3 Estudios complementarios en remodelación ósea	11
2.4. Criterios diagnósticos	13
2.4.1 Diagnóstico de osteoporosis	15
2.5. Los estrógenos y su asociación con la densidad mineral ósea	17
2.6 Determinantes genéticos de la Osteoporosis	21
2.7 Polimorfismos génicos.	27
2.8 Estrategias para identificar los genes asociados a osteoporosis	29
2.8.1 Marcadores de DNA	29
2.8.2 Minisatélites y Microsatélites.	30
2.8.3 SNPs.	32
2.8.4 QTLs.	32
2.9 Los polimorfismos del gen del receptor de estrógeno y la osteoporosis	33
2.10 Utilidad de los polimorfismos genéticos en el diagnóstico de la osteoporosis	36
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>37</b>
3.1 Justificación	37
3.2 Objetivos.	39
3.2.1. Objetivo General	39
3.2.2. Objetivos particulares	39
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	<b>40</b>
4.1. Selección de Sujetos	40
4.2 Medición de la Densidad Mineral Ósea	42
4.3 Extracción de DNA	42
4.4 Determinación espectrofotométrica de DNA	44
4.5 Solución de DNA.	44
4.6 Locus analizado.	44
4.7 Determinación del polimorfismo microsatélite por PCR.	45
4.8 Condiciones de Amplificación Estandarizadas	47



4.9 Electroforesis en gel de agarosa.	47
4.10. Análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar (EC)	48
4.11 Condiciones de Electroforesis Capilar (EC)	48
4.12. Validación del método.	49
4.13. Diagrama Experimental.	52
V. RESULTADOS.	53
5.1 Valoración de la DMO.	53
5.2 Frecuencias Alélicas.	56
5.3. Frecuencias Genotípicas.	60
5.4 Ley de Hardy-Weinberg.	62
5.5 Diversidad genética.	62
5.6 Correlaciones entre Genotipos y DMO.	64
VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	67
VII. CONCLUSIONES.	73
VIII. PERSPECTIVAS.	75
XI. REFERENCIAS.	76
ANEXOS	A1

## ABREVIATURAS

AHSG	Glicoproteína $\alpha$ 2HS
ApoE	Apolipoproteína E
ASO	Hibridación Alelo específico de oligonucleótidos
BGLAP	Osteocalcina
BRU	Unidades de remodelación ósea
CALCAR	Receptor de calcitonina
CASR	Receptor sensible al calcio
COLIA1	Colágena tipo I $\alpha$ 1•
COLIA2	Colágena tipo I $\alpha$ 2•
DBH	Dominio de unión al DNA
DC	Dicigótico
DE	Desviación estándar
DMO	Densidad mineral ósea
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsDNA	DNA doble cadena
EC (CE)	Electroforesis capilar
ESR $\beta$	Receptor de estrógeno beta
ESR $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
FART	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
HZ	Heterocigocidad
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gamma
LBD	Dominio de unión-ligando
MC	Monocigótico
mtDNA	DNA mitocondrial
NDH	Dominio amino-terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Osteoporosis
PCA	Probabilidad de coincidencia al azar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Poder de discriminación
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PTH	Hormona paratiroidea
QTL	Loci de rasgos cuantitativos
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento por enzimas de restricción
SNP	Polimorfismo de nucleótido sencillo
SPOCK	Osteonectina
SPP1	Osteopontina
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
STR	Microsatélite (short tandem repeat)
TNF $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Factor de Necrosis tumoral alfa
TNF $\beta$ (TGF- $\beta$ 1)	Factor de Necrosis tumoral beta
VDR	Receptor de vitamina D
VNTR	Minisatélite (Variable number of tandem repeat)

## I. INTRODUCCIÓN.

La osteoporosis (OP) es una enfermedad esquelética sistémica multifactorial caracterizada por la disminución de la masa ósea y el deterioro microestructural del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad del hueso y de la susceptibilidad para el desarrollo de fracturas. La OP representa uno de los problemas de salud pública a niveles nacional y mundial, que se ha incrementado día con día. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OP es el quinto problema de salud pública a nivel mundial. Para el 2003 en México se ha registrado que el 20% de las mujeres tiene OP y cerca del 40% presentan osteopenia (fase primaria de la enfermedad). El 25% de los afectados por OP mueren a consecuencia de una complicación ósea, mientras que otro 25%, presentan fracturas que les impedirán recuperar su calidad de vida<sup>1</sup>.

La atención de pacientes con OP repercute sobre nuestra economía nacional, ya que por cada paciente con OP se gastan aproximadamente 60 mil pesos diarios, lo equivalente a 730 millones de dólares anuales, esto, sin tomar en cuenta la recuperación, en la cual se invierten cerca de 10 mil a 90 mil pesos<sup>1</sup>.

La OP, cursa generalmente como una enfermedad silenciosa, siendo su principal indicador la disminución de la densidad mineral ósea (DMO), la cual se relaciona de manera directa con diversos factores, como son: **los agentes ambientales** (mala alimentación que se refleja por una pobre ingesta de calcio, fósforo, magnesio, el consumo de alcohol, tabaquismo, la falta de ejercicio físico, y vida sedentaria, entre otros), **los factores intrínsecos** (implicados en el metabolismo mineral, los cuales, se relacionan con la disminución o modificación de receptores de hormonas esteroideas y citocinas). Recientemente este desorden se ha asociado con **factores genéticos**, donde estudios en humanos y en modelos animales sugirieron que los factores genéticos programan las características estructurales del hueso. En la pasada década, debido a los primeros datos obtenidos por medio del proyecto del genoma humano, se vio incrementado el interés por el estudio de la relación entre la genética y la OP. Existen varios genes candidatos a la predisposición a OP, sin contar con el número de SNP (Single Nucleotide Polymorphic) que se incrementan de forma dramática día con día.<sup>2,3,4,5,6</sup>

## II. MARCO TEÓRICO.

### 2.1 ¿Qué es la Osteoporosis?

- La OP es una enfermedad multifactorial caracterizada por disminución de la masa ósea y deterioro microestructural del tejido óseo, lo que conduce al aumento de la fragilidad del hueso y de la susceptibilidad para el desarrollo de las fracturas.

La OP, no es una enfermedad propia de las personas de edad avanzada, hace algunos años se pensaba que sólo afectaba a las mujeres, sin embargo, hoy sabemos que también los hombres y las personas jóvenes de ambos sexos pueden presentarla. De acuerdo con los criterios diagnósticos propuestos por la OMS, si se considera simultáneamente la densidad ósea en las tres localizaciones típicas (muñeca, columna y cadera), se calcula que el 30 % de las mujeres posmenopáusicas serían osteoporóticas.

Se dice que la incidencia aumenta exponencialmente con la edad a partir de los 75 años y se calcula que 1 de cada 3 personas mayores de 80 años sufre o ha sufrido una fractura de cadera, sin embargo, hoy se sabe que muchas mujeres jóvenes mayores de 20 años pueden manifestar OP. La epidemiología de los aplastamientos vertebrales es menos conocida, aparecen fundamentalmente a partir de los 60-65 años y su prevalencia se sitúa en torno al 25 % en los varones y al 40 % en las mujeres mayores de esta edad. La fractura del tercio distal del radio (fractura de Colles) es también frecuente, aunque sus características epidemiológicas son algo distintas. Predomina en mujeres, pero la edad de inicio es más temprana (en torno a los 55 años). En los varones la incidencia no varía prácticamente con la edad. A pesar de que la pérdida de masa ósea constituye el factor más importante en el desarrollo de las fracturas, también influyen otros factores, como la arquitectura trabecular, la acumulación de microfracturas o la propensión a las caídas.<sup>7</sup>

La determinación del padecimiento de la OP antes que se presente la sintomatología es muy difícil de obtener, hasta hace unos años se tendía a reservar el diagnóstico de OP para aquellas situaciones en las que ya estaban presentes las fracturas. Sin embargo, un grupo de expertos de la OMS propuso a mediados de la década pasada unos criterios diagnósticos basados en la deter-

minación de la DMO. Sin embargo, en varones y en mujeres jóvenes (y en mujeres de distinto origen racial) aún no existen criterios definidos.

Cualquier hueso del esqueleto, salvo los del cráneo, puede lesionarse, aunque las fracturas más frecuentes son las del tercio proximal del fémur (también denominadas fracturas de cadera), los aplastamientos vertebrales y la fractura del tercio distal del radio (fractura de Colles). En nuestro país según datos poblacionales, el 20% de las mujeres tiene OP y cerca del 40% presentan osteopenia (fase primaria de la enfermedad). Datos alarmantes señalan que cerca del 25% de los afectados por OP mueren a consecuencia de una complicación ósea, mientras que otro 25%, presentan fracturas que les impedirán recuperar su capacidad para desenvolverse normalmente en sus actividades cotidianas.

La OMS señala que a nivel mundial la frecuencia de presentar OP es igual a la frecuencia de presentar cáncer de mama, cáncer cervicouterino y cáncer de ovarios de manera conjunta.<sup>7</sup>

Normalmente, el hueso se renueva mediante la sucesión de fenómenos de destrucción y formación (remodelación ósea). A partir de los 30-40 años se aprecia un ligero balance negativo en cada unidad (la destrucción supera a la formación), que explica la pérdida fisiológica de masa ósea que acontece con la edad (0,54 % anual pérdida). Esta pérdida puede ser todavía más notable si el número de unidades de remodelación ósea (BRU) aumenta. La OP por aumento del número de BRU se califica como OP de alto recambio. Cuando la pérdida de hueso se produce de forma rápida (generalmente por aumentar intensamente la resorción), pueden llegar a perforarse las trabéculas, mientras que si la pérdida es lenta, sólo presentan adelgazamiento.

La masa ósea de un individuo en un momento determinado depende de la cantidad de hueso obtenido al final del desarrollo esquelético y de la pérdida posterior. Existen múltiples factores, con distinta relevancia, que influyen sobre ambos aspectos. Riggs y Melton han intentado resumirlos utilizando la fórmula:<sup>8 9</sup>

$$Y = I - (a_1t_1 + a_2t_2 + a_3t_3)$$

Donde Y representa la masa ósea en un momento determinado, I la cantidad de hueso alcanzada

en el envejecimiento,  $a_2$  los relacionados con la menopausia y  $a_3$  otros factores. Los símbolos  $t_1$ ,  $t_2$ , y  $t_3$ , representan el tiempo de acción de los diversos factores.

Masa ósea inicial (I). La masa ósea alcanzada al final del desarrollo guarda relación con factores genéticos (raza, sexo) y ambientales (dieta, ejercicio físico), siendo los primeros los más importantes. La masa ósea es menor en la raza blanca que en la negra y las mujeres alcanzan un desarrollo esquelético menor que los varones. En este aspecto puede observarse variaciones genéticas que pueden estar implicadas en el metabolismo mineral óseo; como se explicará más adelante en este trabajo.<sup>8</sup>

Edad ( $a_1t_1$ ). Como se ha comentado, a partir de los 35-40 años se produce una pérdida fisiológica de hueso (alrededor del 0,5-1 % anual) que se debe al establecimiento de un equilibrio óseo negativo en las BRU. Al parecer son varias las razones que contribuyen a ello. La menor actividad física y probablemente también el propio proceso del envejecimiento, disminuyen la actividad osteoblástica. Por otro lado, el aumento en la secreción de hormona paratifoidea (/PTH) que aparece con la edad podría estar relacionada con el aumento de la actividad osteoclástica, que se puede originar por la pérdida de la función renal, síntesis insuficiente de calcitriol, disminución en la absorción intestinal de calcio y menor dotación de vitamina D.

Menopausia ( $a_2t_2$ ). Durante los 5-10 años que siguen al cese de la actividad ovárica aumenta el recambio óseo, lo que determina una pérdida acelerada de hueso (alrededor del 3 % anual) que afecta sobre todo al hueso trabecular metabólicamente más activo que el cortical.<sup>10</sup>

El mecanismo responsable parece guardar relación con la privación estrogénica, que repercutiría sobre las células óseas directamente (recientemente se ha demostrado la existencia de receptores para los estrógenos en estas células) o indirectamente, facilitando la acción de la PTH, disminuyendo las concentraciones de calcitonina, o bien estimulando la síntesis de citocinas osteorresortivas (interleucina 1; *IL-1*, interleucina 6; *IL-6*, Factor de necrosis tumoral; *TNF*, Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; *GM-CSF*). Algo parecido se observa en otras situaciones que cursan con déficit estrogénico (síndrome de Turner, anorexia nerviosa).

En el varón, el déficit androgénico (síndrome de Klinefelter, prolactinoma) también facilita la pérdida de hueso.

Otros factores ( $a_{3t3}$ ). Existen además otros factores que se conocen en conjunto como esporádicos. Los más importantes se señalan en la tabla 1.

**TABLA 1. Factores de Riesgo para Osteoporosis.**

Obligados	Esporádicos	Fármacos
	<b>Hábitos</b>	
Edad	Consumo de tabaco y alcohol	Glucocorticoides
Raza (blanca/asiática)	Inactividad física	Hormonas tiroideas
Sexo (femenino)	Baja ingesta de calcio	Antiácidos (aluminio)
Menopausia	Alta ingesta proteica	Anticonvulsivantes
	Delgadez	Anticoagulantes
	Déficit de vitamina D	Citostáticos
		Ciclosporina
	<b>Otras enfermedades</b>	
	Hipercortisolismo	
	Hipertiroidismo	
	Hiperparatiroidismo	
	Diabetes mellitus tipo 1	
	Anorexia nerviosa	
	Artritis reumatoide	
	Gastropatías	
	Hepatopatías crónicas	
	Malabsorción	
	Mieloma	
	Leucemia/linfoma	
	Anemias hemolíticas	
	Mastocitosis	

De esta forma se resumen los factores a los que se encuentra ligada la OP, aunque cabe mencionar que todos estos factores se modulan por la expresión de factores genéticos que programan las características estructurales del hueso. Esto significa que la pérdida de la DMO, puede estar determinada desde el nacimiento de cada individuo, estando afectados uno o diversos genes que influyen sobre el fenotipo óseo. Por lo tanto, muchos de estos problemas, tanto enfermedades como los defectos en ciertos receptores relacionados a problemas de OP son resultado de mutaciones o polimorfismos que son capaces de provocar susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad.

La aparición de fracturas, con las consiguientes manifestaciones acompañantes (dolor, impotencia funcional o alteración de la movilidad y deformidad) constituye el rasgo clínico fundamental de esta enfermedad. Debe insistirse en la idea de que si se incluyen en el concepto de OP las situaciones de disminución de masa ósea sin fractura, un número sustancial de pacientes osteoporóticos es asintomático, ya que la OP sólo determina síntomas a través de las fracturas que condiciona.

*Riggs y Melton* han propuesto distinguir sobre la base de criterios clínicos, dos grandes síndromes osteoporóticos:

- Osteoporosis de tipo I. Afecta primordialmente a mujeres sobre los 10-15 años de la menopausia, aunque los varones pueden padecer un cuadro similar (la relación mujer/varón es de 6:1). El hueso deficitario es el trabecular y cursa con fracturas vertebrales y, en menor medida, fractura del tercio distal del radio.
- Osteoporosis de tipo II. También predomina en el sexo femenino, aunque la relación mujer/hombre es mucho más baja que en el aplastamiento vertebral (2: 1) y la edad de aparición más tardía (en general, después de los 75 años). Se afecta sustancialmente el hueso cortical y la fractura de cadera constituye el hallazgo clínico habitual. Estos enfermos pueden mostrar también un discreto acuñaamiento asintomático de las vértebras mediotorácicas que acentúa la cifosis dorsal fisiológica.

## 2.2 Fisiología del Hueso.

El hueso, está constituido por una matriz orgánica que contiene fibras de colágeno (fundamentalmente de tipo I) y material interfibrilar, sobre la que se deposita el mineral óseo, que está compuesto fundamentalmente por sales de fosfato cálcico (cristal de hidroxapatita). La proteína más abundante de la sustancia intercelular es la osteocalcina. Las células de este tejido son los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos.<sup>11</sup>

La disposición de las fibras colágenas permite diferenciar dos tipos de tejido: uno maduro o laminar y otro inmaduro fibroso, o también llamado plexiforme. El hueso del adulto es, en su mayor parte, de tipo laminar, y se caracteriza porque en él las fibras de colágeno se ordenan



configurando láminas óseas que pueden disponerse en cilindros concéntricos alrededor de un canal (conductos de Havers), o formar un entramado de tabiques que se orientan según las líneas de fuerza, entre los que quedan unos huecos que están ocupados por el tejido hemopoyético (hueso trabecular o esponjoso).

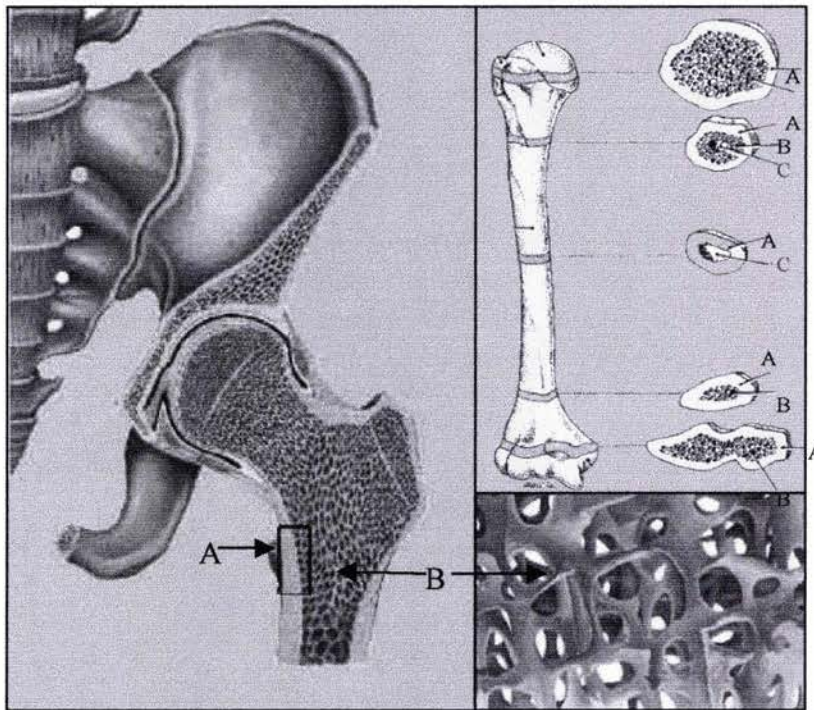
El hueso compacto forma la diáfisis de los huesos largos, cortos o planos y la capa externa de las metáfisis, y las epífisis. El interior de todas estas estructuras óseas está constituido por tejido trabecular. Alrededor del 80 % del esqueleto del adulto está constituido por hueso cortical, y el 20 % restante por hueso trabecular (fig. 1). El hueso cortical está recubierto en su superficie externa por periostio y en su cara interna por endostio que recubre los conductos de Havers y las trabéculas. En estas superficies la actividad de las células óseas es mayor, casi dos terceras partes de las superficies óseas corresponden a hueso trabecular, por lo que no es de extrañar que, a pesar de ser cuantitativamente inferior al cortical, suponga la fracción metabólicamente más activa.<sup>11</sup>

### **2.2.1 Modelación y remodelación ósea.**

Se entiende por modelación ósea a la serie de cambios que experimenta el hueso durante su desarrollo, hasta que alcanza el tamaño y la forma de la edad adulta. El fenómeno de remodelación ósea, se manifiesta debido a que el hueso está sometido a un proceso continuo de renovación mediante la destrucción por los osteoclastos de pequeñas unidades microscópicas de tejido, dispersas por el esqueleto, que son posteriormente sustituidas por tejido óseo nuevo formado por los osteoblastos, y las citadas unidades son las denominadas BRU.<sup>12</sup>

El proceso comienza cuando acuden a un determinado foco los precursores de los osteoclastos (fase de activación), que al transformarse en osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso (fase de resorción), labrando una cavidad tuneliforme en el hueso cortical (cono de apertura) o lacunar en el trabecular (laguna de Howship), que más adelante será rellenada por el nuevo tejido formado por los osteoblastos. Inicialmente, los osteoblastos forman sólo la matriz orgánica (osteóide), que se mineraliza unos 15 días después (fase de formación). En el seno de este tejido óseo recién formado van quedando enterrados los osteoblastos, que se transforman así en osteocitos. La fase de resorción dura unas dos semanas y la de formación tres

meses. Entre ellas hay un período de aparente inactividad (fase de inversión), que también dura unas 2 semanas. Al finalizar el proceso de remodelación, los osteoblastos que se encuentran en las superficies óseas se transforman en osteoblastos en reposo o células de revestimiento, que tapizan dichas superficies y las separan del medio interno (fase de reposo) (fig. 2).

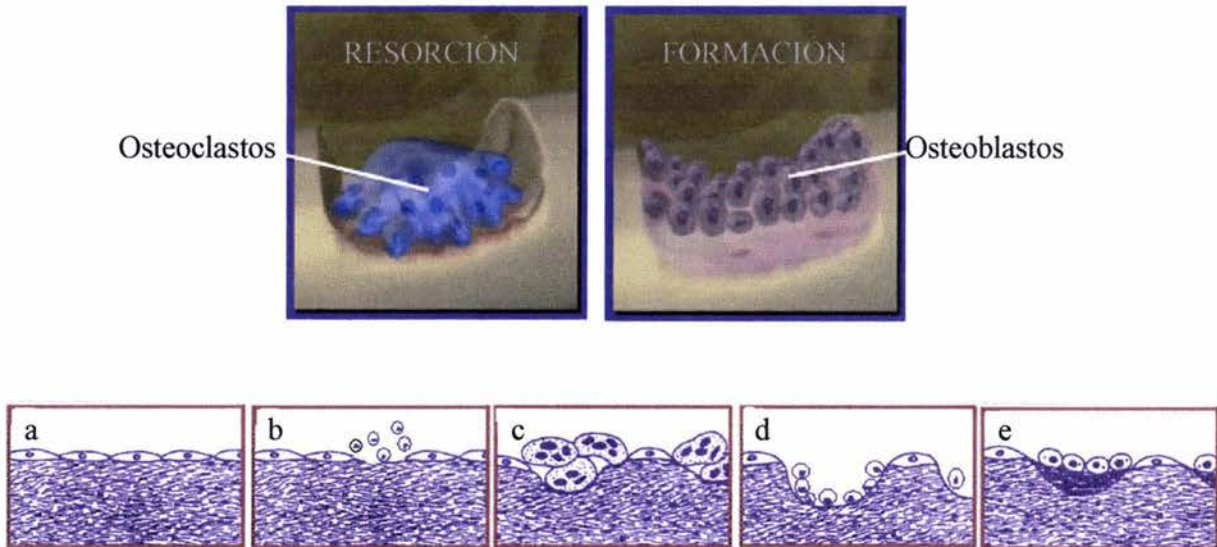


**Figura 1. Anatomía ósea.** A) Muestra el hueso cortical. B) Muestra el hueso Trabecular. C) Muestra la cavidad medular.

La diferencia entre la cantidad de hueso que se destruye y la que se forma en cada una de las BRU se conoce como balance óseo, siendo su valor igual a cero hasta los 30-40 años, ya que en teoría la misma cantidad de hueso destruido es posteriormente formado. Cuando hay una adecuada coordinación temporal y espacial entre la activación de los osteoblastos y los osteoclastos se dice que existe un acoplamiento entre ambos.

A partir de los 40 años hay un pequeño balance negativo (aproximadamente del 3 % en cada BRU) que es el responsable de la pérdida fisiológica de masa ósea que se produce con la edad. La velocidad de renovación ósea, o lo que es lo mismo, el volumen de hueso renovado en

la unidad de tiempo se conoce con el término de recambio óseo (turnover). Cuando las BRU se encuentran en balance negativo, un aumento de su número, y por lo tanto del recambio, supone un incremento en las pérdidas óseas totales.<sup>12</sup>



**Figura 2. Fases de la remodelación ósea.** a) Reposo (Osteoblastos en reposo); b) Activación (Preosteoclastos); c) Resorción (Osteoclastos); d) Inversión (células mononucleares); e) Formación (Osteoblastos)

Los factores que regulan el proceso de remodelación ósea sólo se conocen de modo parcial. Probablemente existen factores de naturaleza física (estímulos mecánicos y pizoelectrónicos), dado que la inactividad física condiciona una pérdida de masa ósea, aunque los más conocidos son los de carácter humoral. Estos, a su vez, pueden ser sistémicos (factores hormonales) o locales (factores paracrinos). Dentro de los primeros se engloban las hormonas calcitropas (PTH, 1,25-[OH]<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> o calcitriol y calcitonina) y otras hormonas que no están relacionadas específicamente con el metabolismo mineral (hormonas sexuales y tiroideas, glucocorticoides). La PTH favorece la activación de los osteoclastos y secundariamente la de los osteoblastos, aumentando el recambio óseo. No obstante, el equilibrio final es ligeramente negativo, por lo que el resultado global de la PTH sobre la masa ósea es perjudicial. A veces, cuando la acción de la PTH es intermitente, el efecto es positivo. El calcitriol también estimula la resorción ósea.

Sin embargo, debido a que los osteoclastos maduros, a diferencia de los preosteoblastos, no responden directamente al calcitriol ni a la PTH, debido a que no poseen receptores para estas

hormonas y es que responden a través de las señales que envían las células de la estirpe osteoblástica (que son las que realmente poseen receptores para ambas hormonas) sobre las que actúan directamente. Por otro lado, el calcitriol favorece la mineralización ósea al estimular la absorción intestinal de calcio y fósforo, y probablemente al actuar directamente sobre los osteoblastos, además, de que inhibe la secreción de PTH. En cualquier caso, conviene recordar que el resultado final del calcitriol sobre la masa ósea es favorable.

Finalmente, la calcitonina ejerce un efecto inhibitorio directo sobre los osteoclastos, que poseen receptores para esta hormona. Entre las hormonas inespecíficas hay que considerar las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), que ejercen un efecto anabólico sobre el hueso, mientras que el exceso de glucocorticoides y de hormonas tiroideas ejerce un efecto deletéreo sobre el esqueleto.<sup>13</sup>

Otra serie de factores reguladores (locales o paracrinos) ha comenzado a conocerse en los últimos años y su trascendencia real aún no está bien establecida. Dichos factores pueden encontrarse preformados en la matriz ósea, siendo liberados durante el proceso de resorción, o sintetizados *de novo* por los osteoblastos o por las células inmunes. Actúan atrayendo hacia el foco en que se inicia la remodelación a los precursores de los osteoclastos, induciendo su proliferación y diferenciación, estimulando su actuación. Con frecuencia, los factores locales actúan sobre más de uno de estos procesos y el efecto puede ser incluso bifásico. También actúan sobre los osteoblastos. Aún a riesgo de ser excesivamente simplistas, puede decirse que las prostaglandinas, la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y beta (TNF- $\beta$ ), el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) estimulan la resorción ósea. Sin embargo, el TGF- $\beta$ , el IGF-1 y el IGF-11, el IFN $\gamma$  y la IL-4, actuarían en sentido contrario.<sup>13</sup>

### **2.3 Estudios complementarios en remodelación ósea.**

Para valorar la remodelación ósea se realizan diferentes estudios, que aún en la actualidad son solicitados en algunos lugares como pruebas de gabinete. Es cierto que muchos de estos nos ayudan a un posible diagnóstico, pero cabe resaltar que muchos no son específicos en ciertas

patologías, como es la que se investigó en este estudio. A continuación se revisan algunos estudios y el porqué algunos de éstos no son sensibles en el diagnóstico de OP.

*Pruebas de laboratorio.* Habitualmente, hay que determinar las concentraciones de calcio, fósforo y creatinina en sangre y orina, además de otros parámetros no directamente relacionados con el metabolismo mineral (hemograma, VSG, proteinograma). Para valorar el recambio óseo se puede estudiar una serie de sustancias en sangre o en orina cuya concentración o actividad reflejan los grados de formación o la resorción ósea, que se conocen como marcadores del recambio o de la remodelación óseas y son sintetizadas por los osteoblastos (fosfatasa alcalina, osteocalcina, péptidos terminales del procolágeno tipo 1) por los osteoclastos (fosfatasa ácida resistente al tartrato, FART) o son liberadas desde la matriz ósea durante el proceso de resorción (hidroxiprolina, telopéptidos carboxi y amino- terminales del colágeno tipo 1, piridinolina y desoxipiridinolina). Los primeros constituyen los marcadores de formación y los demás los marcadores de resorción ósea (tabla 2).

Sin embargo, hay que señalar, que la sensibilidad de los marcadores actuales sólo permite detectar cambios intensos en la destrucción y formación óseas, por lo que son útiles desde el punto de vista clínico en procesos como la osteomalacia o la enfermedad de Paget, mientras que los trastornos en que estos cambios son más sutiles, como sucede en la OP, su sensibilidad es menor y por ello su utilidad clínica resulta limitada. Además, el interés de los diferentes marcadores varía según los distintos procesos. La osteocalcina, por ejemplo, es preferible a la fosfatasa alcalina como marcador de formación en las osteopatías endocrinológicas (hipertiroidismo, síndrome de Cushing), mientras que en las estructurales (enfermedad de Paget, metástasis óseas) sucede lo contrario.<sup>12</sup>

La FART y el telopéptido carboxiterminal, a diferencia de la hidroxiprolina o de la piridinolina y la desoxipiridinolina, se determinan en la sangre por lo que son preferibles en las situaciones de insuficiencia renal y el consiguiente hiperparatiroidismo secundario. Exceptuando éstas, deben preferirse los puentes de hidroxipiridinium (piridinolina y desoxipiridinolina), que son, con toda probabilidad, los marcadores de destrucción más sensibles de que se dispone. También pueden estudiarse las concentraciones plasmáticas de las distintas hormonas calciotropas (PTH,

metabolitos de la vitamina D, 25-0H-D y 1,25-[OH]<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, calcitonina) y, en su caso, otras hormonas (hormonas tiroideas, sexuales).

**TABLA 2. Marcadores bioquímicos de la remodelación ósea**

Formación	Resorción
Fosfatasa alcalina total (S)	Hidroxi-prolina (O)
Fosfatasa alcalina ósea (S)	Glucósido de Hidroxilisina (O)
Osteocalcina (S)	Calcio/creatina (O)
Propéptido C-terminal del procolágeno I (S)	Puentes de piridinium (O)
Propéptido N-terminal del procolágeno I (S)	Telopéptido N-terminal del colágeno I (S)
	Telopéptido C-terminal del colágeno I (S)
	Fosfatasa ácida resistente al tartrato (S)

*S, determinaciones realizadas en suero; O, determinaciones realizadas en orina.*

*Exploraciones radiológicas.* La radiología convencional desempeña un papel trascendental en el estudio de las osteopatías metabólicas. Ponen de manifiesto fracturas, deformidades y alteraciones en la estructura ósea.

*Gammagrafía ósea.* La gammagrafía ósea con difonato marcado con <sup>99m</sup>Tc permite detectar focos de actividad osteoblástica, independientemente de la naturaleza de ésta. Además, las zonas hipervascularizadas también muestran hipercaptación, por lo que, aunque es más sensible que la radiología convencional, su especificidad es menor.

*Densitometría ósea.* En los últimos años se ha desarrollado una serie de técnicas que permiten cuantificar con gran exactitud y precisión la masa ósea. Estas técnicas deben utilizarse en las mujeres con déficit estrogénico, en los pacientes con hiperparatiroidismo primario asintomático, en personas sometidas a tratamiento esteroideo prolongado y, lógicamente, en el diagnóstico y seguimiento terapéutico de los pacientes osteoporóticos.<sup>8</sup>

#### **2.4. Criterios diagnósticos.**

De acuerdo con la OMS, debe diagnosticarse OP en todas aquellas mujeres con una DMO por debajo de 2.5 desviaciones estándar (DE) con respecto a la media juvenil, así como osteopenia, cuando presenten una disminución de la DMO entre 1 y 2.5 DE con respecto a la

media juvenil. Con esto podemos determinar que el diagnóstico diferencial se realiza a través de la densitometría ósea.

En nuestro país el aparato densitométrico se encuentra alimentado con datos pertenecientes a la población latina en general. Sin embargo, para hombres y mujeres jóvenes no hay datos establecidos, de allí la importancia de la genética poblacional.

En cuanto al diagnóstico de fractura osteoporótica, ésta se establece cuando una fractura característica de la enfermedad (cadera, columna, muñeca), se desarrolla en una persona con criterios densitométricos de OP. Las fracturas de los huesos largos no plantean especiales problemas diagnósticos. Sin embargo, los aplastamientos vertebrales pueden ser más difíciles de evaluar. Habitualmente, el paciente acude al médico por dolor de espalda. Otras veces el aplastamiento es asintomático, descubriéndose casualmente. La aceptación del diagnóstico de aplastamiento exige que se cumplan los criterios cuantitativos ya comentados. Una vez aceptada su existencia, debe establecer si su naturaleza es osteoporótica o si guarda relación con otra enfermedad (metástasis, espondilitis, osteomalacia, traumatismos). Clínicamente, la persistencia del dolor agudo durante más de 4 semanas, junto con la aparición de manifestaciones neurológicas, debe hacer dudar del diagnóstico de fractura osteoporótica.<sup>14</sup>

Cabe enfatizar que esta patogénesis generalmente es asintomática, por lo que mucha gente que presenta OP, aún no tengan conocimiento de ella. En la radiología, la presencia de aplastamiento por encima de D4, así como la lesión de los pedículos y la lisis cortical, sugieren otros procesos. La densitometría debe mostrar una disminución en la masa ósea, mientras que los datos analíticos habituales deben ser normales. Finalmente, deben descartarse las formas secundarias de osteoporosis potencialmente tratables (hiperparatiroidismo, mieloma, hipertiroidismo) mediante el estudio de la calcemia, el proteinograma, la proteinuria de Bence-Jones y los valores de hormonas tiroideas. Si el paciente presenta hábito cushingoide, se realizará una prueba de supresión con dexametasona.

En la actualidad, se inicia el camino para el desarrollo de un diagnóstico molecular eficaz, con lo cual se podría diagnosticar y prevenir la enfermedad con mucho tiempo de antelación, dicho diagnóstico no existe aún de manera completa, pero la identificación de genes asociados y

así, su interacción con la enfermedad parecen ser una gran alternativa para el desarrollo de este tipo de técnicas.

#### **2.4.1 Diagnóstico de osteoporosis.**

Debido a que la OP cursa de forma asintomática y tomando en cuenta la dificultad del diagnóstico preventivo, así como el incremento en la probabilidad de fracturas, y la disminución de la DMO, resulta indispensable determinar de forma eficaz y rápida la predisposición de padecer esta enfermedad. Actualmente, se cuentan con una serie de estudios clínicos, los cuales se describen a continuación.

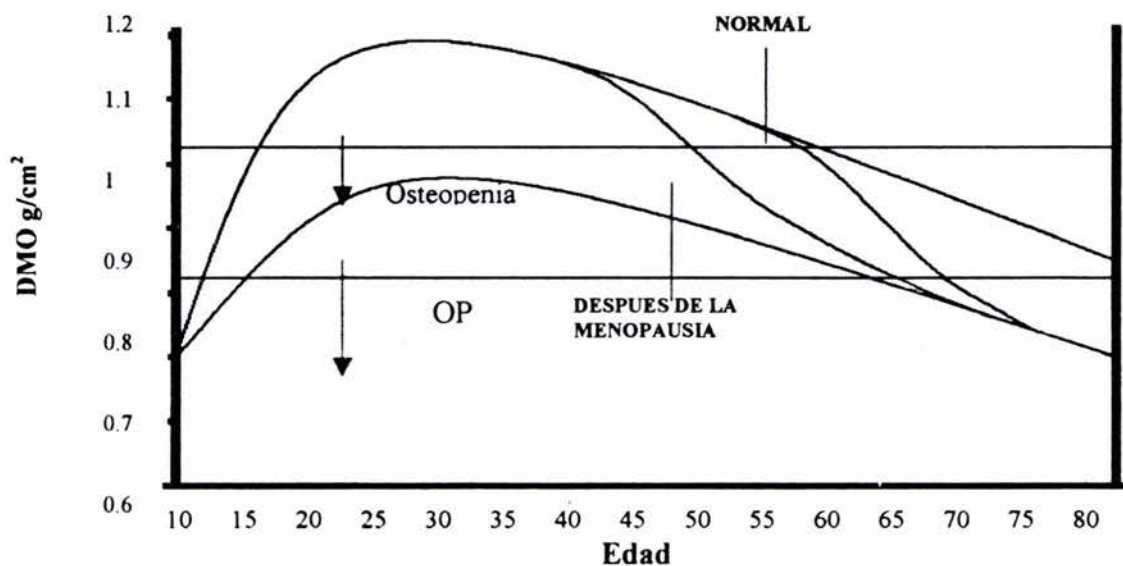
*Pruebas de laboratorio.* Este tipo de análisis resulta poco informativo debido a que no se observan alteraciones analíticas relevantes en esta enfermedad, por lo tanto son poco necesarias para su diagnóstico. Los parámetros del metabolismo fosfocálcico son normales y los marcadores bioquímicos de la remodelación tienden a serlo (en el 20 % de los casos se encuentran ligeramente elevados). Sólo los pacientes con formas secundarias de OP pueden presentar las alteraciones analíticas propias de la enfermedad de base.

*Hallazgos Radiológicos.* Los clásicos signos vertebrales (acentuación de los platillos, trabeculación vertical, hipertransparencia) no son útiles para valorar la densidad ósea con fiabilidad. Tampoco la cuantificación del grosor de la cortical en el segundo metacarpiano (radiogrametría) y la valoración de la estructura trabecular en el extremo proximal del fémur son de gran utilidad clínica. Por el contrario, la radiología convencional es imprescindible para establecer el diagnóstico de las fracturas.

*Densitometría ósea.* La absorciometría por rayos X de doble nivel de energía es, probablemente, el método más empleado debido a que permite valorar con gran precisión (1 %) y exactitud (3-5 %) la densidad mineral ósea en la columna (L1 -L4) y en el extremo proximal del fémur (cuello, región intertrocanterea y triángulo de Ward). Además, la irradiación que sufre el paciente es escasa y el costo económico no es excesivo. En la actualidad es lo mejor para un diagnóstico de OP, así como para valorar la respuesta terapéutica. Éste es un diagnóstico certero que muestra el contenido mineral óseo (CMO; g) y la densidad mineral ósea (DMO;  $g/cm^2$ ),



con lo cual se puede observar el porcentaje de pérdida, y con ello se puede dar un diagnóstico, además evalúa con cifras absolutas conocidas como z-scores la relación entre sexo y edad del sujeto estudiado. Los valores con los que se alimenta el aparato se basan en el comportamiento mostrado por los habitantes que se encuentran geográficamente en cada zona o región. La pérdida de DMO sigue un patrón similar en cada zona geográfica, con pequeñas diferencias en valores; la línea de pérdida relacionada con la edad, y los valores que presenta la OP se muestran en la figura 4.



**Figura 4.** Variación de la DMO, en mujeres a diferentes edades. Se observan el índice de pérdida de DMO, de un individuo normal y de individuos con OP. Así como el rango en que se presenta osteopenia y OP según los valores de Zscore. 1999 Cambridge University Press

*Biopsia ósea.* La biopsia ósea suele reservarse para situaciones concretas, fundamentalmente cuando existen dudas acerca del diagnóstico (p. ej., diagnóstico diferencial con la osteomalacia). Las alteraciones típicas de la OP consisten en adelgazamiento de la cortical y disminución del volumen trabecular, sin alteración de la proporción osteoide/hueso mineralizado. La administración de tetraciclinas permite conocer una serie de parámetros dinámicos, como la velocidad a que se desplaza el frente de mineralización, el tiempo que tarda en mineralizarse el osteoide o el volumen de hueso formado por unidad de superficie ósea en un determinado periodo de tiempo, que informan de si el recambio óseo es normal, está aumentado o está disminuido.

## 2.5 Los estrógenos y su asociación con la densidad mineral ósea.

Se sabe que las hormonas sexuales de origen esteroide reflejan efectos benéficos en el desarrollo y mantenimiento de la estructura ósea, incluyendo el control durante el crecimiento, la maduración ósea y el bloqueo durante el crecimiento longitudinal del hueso, en la regulación del metabolismo óseo cortical y trabecular, así como en el alcance de la concentración máxima de masa ósea y la inhibición de pérdida de la misma.

Los estrógenos como tales, juegan un papel importante en el desarrollo de células óseas y en el mantenimiento de la microarquitectura del tejido óseo. Estos actúan al unirse y activar a los receptores de estrógenos (ESR). Hasta hace unos años sólo se conocía una forma del receptor de estrógeno, pero estudios realizados en el año de 1996 mostraron la presencia de una nueva forma de este tipo de receptores, al que se le denominó receptor de estrógeno beta ( $ESR\beta$ ) que es codificado por un nuevo gen, con respecto al ya conocido receptor de estrógeno alfa ( $ESR\alpha$ ). Ambos receptores fueron identificados en osteoblastos y en células progenitoras en la médula ósea, aún siendo la expresión de ESR en osteoclastos de cierta manera controversial.<sup>14, 15, 16, 17</sup>

Cada día es más evidente que el papel de los estrógenos es fundamental en el crecimiento, desarrollo, maduración y mantenimiento del esqueleto, teniendo los mismos efectos tanto en hombres como en mujeres. Estos efectos se hacen notar desde la etapa pre-pubertal, pasando por la pubertad en donde el incremento de la DMO aumenta de manera notable. Esto se constata con estudios en donde se dosifican bajas concentraciones de estradiol en niños y niñas en etapa pre-pubertal, incrementándose con ello, la velocidad en el crecimiento óseo. En la pubertad el crecimiento es por mucho mayor para ambos sexos, debido principalmente al aumento en los niveles de estrógeno. Durante la niñez y la pubertad los estrógenos no sólo promueven el crecimiento óseo, sino que también son importantes en la mineralización ósea.<sup>18, 19, 20</sup>

Diversas observaciones muestran el aumento de la DMO en relación a la presencia de estrógenos. El seguimiento o historia menstrual es el mejor predictor de DMO del tejido trabecular en mujeres pre-menopáusicas.<sup>21</sup>

Diversos reportes en diferentes poblaciones muestran una correlación positiva entre la masa

ósea y los niveles de estrógeno séricos, no sólo en mujeres, si no también en hombres. La importancia de los estrógenos en el hombre, fue demostrada por medio del reporte de un joven de sexo masculino, quien resulto ser homocigoto para una mutación del gen  $ESR\alpha$ , quien a su corta edad presentó OP grave. Similares son las características descritas en 2 hombres con deficiencia de aromatasas (mutaciones en el gen que codifica para la enzima aromatasas) la cual es la clave para la conversión de andrógenos en estrógenos. En mujeres con deficiencia estrogénica, causada por la menopausia o la remoción de los ovarios, tiene como resultado una marcada disminución en la DMO como resultado de un incremento en la resorción ósea, la cual se recupera por terapias de reemplazamiento de estrógenos (TRE)<sup>21, 22, 23</sup>.

Recientemente, se ha sugerido que los estrógenos pueden afectar directamente a los osteoclastos al igual que de manera indirecta por supresión de la producción de citocinas necesarias para la formación de osteoblastos o células precursoras de la médula ósea. Estas incluyen a la IL-1, IL6, TNF  $\alpha$ , y prostaglandinas, provocando con esto un aumento en la resorción ósea. Por otra parte, los receptores de estrógeno pueden ser encontrados en el intestino, con lo que se sugiere que la acción de los estrógenos en tejidos no esqueléticos beneficia indirectamente al tejido óseo, esto se debe entre otras cosas a que los estrógenos estimulan la absorción de calcio, de manera independiente a las hormonas calciotrópicas.<sup>23, 24, 25</sup>

Igualmente  $ESR\alpha$  y  $ESR\beta$  se encuentran en el riñón, los cuales al presentar la unión con sus ligandos provocan el transporte y la conservación renal del  $Ca^{++}$ , por lo tanto la falta de acción estrogénica secundaria provocada por problemas de interacción entre el receptor y el ligando en tejidos no esqueléticos, lo que resulta en un balance negativo de calcio, una deficiente absorción de calcio en el intestino, y un aumento en la excreción renal, lo cual repercute también sobre el fenotipo óseo.

Es así, como la integridad de los receptores de estrógeno ( $ESR\alpha$  y  $ESR\beta$ ), son importantes en la susceptibilidad de la OP, por lo tanto debido a que en las células óseas la acción de los estrógenos depende de su interacción con el receptor estrogénico específico, algún defecto de estos receptores a consecuencia de mutaciones o polimorfismos son capaces de modificar o eliminar la interacción con su ligando, suprimiendo con ello la acción hormonal y disminuyendo así la actividad metabólica del hueso.

Se han realizado estudios para ligar la patogénesis con algún problema en el receptor, los primeros estudios se realizaron con ESR $\alpha$ , ya que fue el primero en ser caracterizado, la mutación del receptor de estrógeno  $\alpha$  que fue asociada a OP severa con el incremento de pérdida o recambio óseo y posteriormente la comparación de ratones ESR  $\alpha$  knock out (ESR $\alpha$ KO) con ratones controles (wild-type) dieron como resultado un decremento en la mineralización ósea para los primeros.<sup>26 27</sup>

Estudios recientes señalan que la acción estrogénica inducida, después de una ooforectomía, se lleva a cabo por la interacción del ligando con los receptores tanto ESR  $\alpha$  como ESR  $\beta$ , además de que en ambos receptores pueden tener una unión en la misma intensidad con su ligando. Actualmente se sugiere que la presencia de cada uno de los receptores puede estar regulada, ya que en cultivos *in vitro* de células precursoras, obtenidas de ratas sin ovarios (con OP), presentan diferencias al inducir un estrógeno, mientras las alfa aumentan, las beta disminuyen, pero esto toda vía no se demuestra del todo. Tal vez, los resultados más contundentes que relacionan los estrógenos con la OP, es la determinación que estos interactúan con los receptores de estrógeno (ESR $\alpha$  y ESR  $\beta$ ), tanto en células osteoblásticas, como en osteoclasticas, aunque su acción es individual en cada tipo de célula, ya que en las primeras induce una acción antiapoptosis, mientras en las segundas favorece la apoptosis en estas. Los receptores de estrógenos se expresan en diferentes tejidos a lo largo del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema inmune, el tracto urogenital, el tracto gastrointestinal, los riñones, intestinos, y desde luego en tejido óseo (tabla 3).<sup>28 29 30 31</sup>

La distribución corporal de ESR $\alpha$  y ESR  $\beta$  es similar, pero estructuralmente presentan diferencias. Cada ESRs esta conformado por 5 dominios comenzando por el dominio N-terminal (NHD), donde el ESR $\alpha$  tiene 185 aminoácidos, mientras que el ESR $\beta$  tiene solo 148 aminoácidos, con lo que respecta al dominio unión-DNA (DBH) de ambos receptores, muestran una alta homología (sólo difieren en 3 a.a.) mientras que el domino de unión-ligando (LBD) presentan sólo el 59% de homología (fig. 3), lo que indica que los dos receptores pueden actuar con diferentes grupos de proteínas, lo que les puede atribuir las diferencias funcionales que conservan ambos receptores.<sup>32</sup>

TABLA 3. Distribución de ESRs en diferentes tejidos.

TEJIDOS		Presencia de Receptores	
		ESR $\alpha$	ESR $\beta$
Sistema Nervioso Central (SNC)	Cerebro		
	Espina Dorsal		
Sistema Inmune	Médula ósea		
	Timo		
	Bazo		
Músculo	Esquelético		
	Cardíaco		
Glándulas secretoras.	Hígado		
	Páncreas		
	Mamarias		
Sistema óseo	Hueso		
Sistema Gastrointestinal	Intestinos		
Sistema Urogenital	Próstata		
Otros	Riñón		

El sombreado intenso corresponde a la presencia de Receptores en el tejido indicado. El sombreado de menor intensidad, representa una baja concentración de receptores, y la ausencia de color señala la ausencia de receptores en el tejido específico.

	1	185	251	355	549	595
ESR $\alpha$	<b>NHD</b>	<b>DBH</b>		<b>LBD</b>		<b>F</b>
	1	148	214	304	500	530
ESR $\beta$	<b>16</b>	<b>97</b>	<b>30</b>	<b>59</b>		<b>18</b>

Figura 3. Comparación de las estructuras primarias de ESR $\alpha$  y ESR $\beta$ , respectivamente. Con el número 1 se inicia el número de aminoácidos en el dominio N terminal. Los números dentro de cada receptor  $\beta$  representan la homología (%) entre los dominios de ambos receptor. Tomado de Gustafsson et al 1999<sup>32</sup>

## 2.6 Determinantes genéticos de la Osteoporosis.

El análisis de la susceptibilidad familiar en la OP al igual que en otras enfermedades de origen multifactorial como la hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus, cáncer, etc. resulta complejo, ya que es el resultado del efecto de más de dos genes capaces de responder a los factores ambientales. Sin embargo, estas variaciones cuantitativas y cualitativas propias de la herencia multifactorial o poligénica permiten establecer curvas de distribución de tipo normal (Gaussiano) en las poblaciones.<sup>33, 34</sup>

Existen evidencias de que la osteoporosis exhibe cierta susceptibilidad genética; algunas se relacionan con la presencia de OP entre diferentes grupos étnicos, por agregación familiar, por semejanzas familiares o poblacionales conforme a la historia natural de la enfermedad, o bien con relación a las respuestas terapéuticas. Aparentemente, algunos de los mecanismos que condicionan esta susceptibilidad hereditaria pueden estar determinados por la presencia de mutaciones o polimorfismos en uno o varios genes, que de alguna u otra manera influyen sobre el fenotipo óseo. Generalmente se trata de genes capaces de responder a diversos agentes ambientales.<sup>35</sup>

Para determinar que alguna enfermedad o patología se relaciona con diferentes factores genéticos, se necesita tener diferentes tipos de evidencia, la cual se realiza a partir de una serie de opciones metodológicas. Inicialmente, se obtienen datos sugestivos, como son estudios de agregación familiar y diferencias entre grupos étnicos. Los primeros, muestran una alta frecuencia de las características patológicas manifestadas en un grupo de pacientes, en comparación a la población en general, y subsecuentemente se realiza una comparación con la frecuencia positiva de la patología, a partir de historias familiares. Mientras que las diferencias entre grupos étnicos, pueden sugerir que factores genéticos, están relacionados con la enfermedad. Paralelamente, a este estudio se pueden realizar estudios de migración de progenitores, con la finalidad de verificar si se encuentran íntimamente relacionados a factores ambientales.

Los modelos animales proveen evidencia indirecta de componentes genéticos en relación a enfermedades comunes. Un modelo biológico se usa como parámetro para identificar factores

genéticos, algunos animales muestran enfermedades análogas al ser humano, con lo cual, se puede verificar los probables genes asociados, y llegar a conclusiones más claras, sin embargo, no muestran definitivamente la etiología de la patología, ya que una conclusión definitiva se realiza a través de estudios en el mismo ser humano.

Otra observación sugestiva, es la relación con síndromes genéticos, esto es, el aumento de la incidencia de la patología, en individuos con síndromes genéticos. Esto puede ser usado como una herramienta más, pero no todas las patologías se relacionan con este comportamiento.

El proceso llega a su final, cuando se adquieren evidencia definitiva, esta evidencia comienza con estudios en gemelos idénticos, considerando la existencia de gemelos monocigóticos (MC), los cuales, presentan el mismo genoma y de gemelos dicigóticos (DC), los cuales, contienen solamente el 50% de su información genética (al igual que en hermanos no gemelos) diversos investigadores han empleado este modelo de estudio tratando de establecer el peso de los factores genéticos con relación al ambiente. Esto es, una alta concordancia en gemelos MC, indica que una significativa parte de la agregación familiar, depende de factores genéticos.

Aunado a estos estudios existen otros, que son usados en casos en condiciones psiquiátricas, los cuales no son fundamentales para cada tipo de patogénesis.

Desde hace algunos años, se han registrado numerosas observaciones epidemiológicas y clínicas que señalan con gran importancia la relación de la genética en la patogénesis de la OP. Inicialmente se observaron diferencias de la DMO y la remodelación ósea entre mujeres de raza negra y mujeres de raza blanca, mostrando en las primeras un incremento de la DMO en diferentes sitios del esqueleto, aún teniendo las mismas características de edad, altura, peso, ingesta de calcio y niveles de actividad física. A partir de esto se comprueba una mayor incidencia de OP en mujeres blancas en comparación con mujeres de color. De la misma forma estas observaciones fueron realizadas entre poblaciones de Polinesia y poblaciones Europeas, encontrando diferencias entre ambas poblaciones. Estas variaciones de incidencia de OP entre grupos étnicos o raciales pueden ser causadas por factores ambientales, pero pueden reflejarse diferencias marcadas en la susceptibilidad.<sup>36, 37, 38</sup>

Estudios familiares confirman la existencia de la contribución genética en la OP, mostrando una correlación en valores de DMO entre madres e hijas, particularmente en la región sacrolumbar de la columna vertebral, teniendo una disminución de la DMO y un alto riesgo de fractura después de la menopausia. Además estudios epidemiológicos similares confirman la importancia de historias familiares positivas a OP, ya que las generaciones subsecuentes muestran un alto índice de riesgo de fracturas.<sup>39, 33, 40, 41</sup>

Por otra parte, se han realizado estudios en gemelos, comparando tanto individuos MC como individuos DC, mostrando una alta concordancia con la masa ósea de los primeros con respecto a los segundos, esto señala la relevante influencia genética que existe sobre el metabolismo óseo. Otros estudios en gemelos MC que refuerzan la influencia genética sobre la masa ósea, muestran una alta heredabilidad, comparados con otros parámetros óseos, como la utilización de ultrasonido y la geometría ósea.

Los estudios densitométricos realizados en gemelos muestran que la concordancia de la DMO de columna vertebral y cuello femoral es mayor en gemelos monocigóticos que en gemelos dicigóticos.

A partir de estos estudios se confirmó la relación entre factores genéticos y ambientales en la patogénesis. Inicialmente, el incremento en el riesgo de fractura fue observado en asociación a historias familiares en las cuales las fracturas persisten a pesar de la que se haya regulado la DMO. Esto soporta que la susceptibilidad genética a las fracturas está mediada por factores adicionales que no sólo predisponen a la baja DMO.<sup>20, 42, 43</sup>

Con las bases y el conocimiento de la presencia de factores a nivel genético, comenzaron a emplearse diferentes técnicas en la identificación y caracterización de genes asociados a la patogénesis, desde análisis de pedigrees multigeneracionales, la búsqueda de alelos asociados, estudios de asociación entre individuos afectados y no afectados, y experimentación en animales.

A partir de 1995, varios grupos de investigación a lo largo de todo el mundo estudiaron la influencia del aspecto genético y su relación con el desarrollo de la OP. Estos estudios, han



mostrado que existe una importante relación entre la genética y las características estructurales óseas. Estudios en humanos y en modelos animales han demostrado los altos niveles de herencia (45 al 80% de varianza) de la densidad del hueso y la estructura para grupos de cualquier edad. Esta herencia se hace aparente antes de la pubertad sugiriendo que los factores genéticos programan la herencia de las características estructurales del hueso. Estos resultados señalan la asociación de la DMO con los factores genéticos, teniendo que la heredabilidad puede ser mayor a 80% y por lo tanto concluir que 80% de los casos de OP son inducidos por factores genéticos y el 20% restante se le atribuyen a factores ambientales.<sup>35</sup>

En la práctica la mejor forma de detectar los genes asociados es por medio de marcadores genéticos (ampliamente polimórficos) y su relación con características fenotípicas (baja DMO y fracturas).

Muchos de estos estudios se realizaron en distintos árboles genealógicos, entre los que destacan, investigaciones en familias Franco-Canadienses, Griegas y judías en donde se observó la predisposición en cuatro diferentes loci localizados en los cromosomas 1p, 2p, 4q, y 11q<sup>m</sup>. De forma similar se realizó un estudio en 10 familias México-Americanas en los que se observó la predisposición en 3 loci más (7q, 8p, 12q). Aunado a estos estudios, se han realizado estudios a partir de marcadores de DNA, por medio de una gran cantidad de marcadores en diferentes genes candidatos encontrándose de 7 a 10 nuevos locis. 8q, 4q, 17q, 6q, 2q, 5q, 7p, entre otros)<sup>44, 45, 46</sup>

Este tipo de estudios en los últimos años han proporcionado una gran cantidad de información, dándonos 23 genes candidatos a la predisposición de osteoporosis (tabla 4), de los cuales pocos se han estudiado de manera extensa y aún otros posiblemente no se han identificado. Algunos de los genes han sido mayormente estudiados en su relación con la OP (Tabla 4).

---

<sup>m</sup> Nota: La nomenclatura p y q se refiere a el brazo del cromosoma en el que se encuentra la región génica, siendo "p" el brazo corto del cromosoma y "q" el brazo largo. La numeración adyacente a las letras p o q, depende de la región génica a lo largo del cromosoma.

TABLA 4. Genes implicados en el desarrollo de OP.

NOMBRE	SIMBOLO	LOCALIZACIÓN	Referencias
Apolipoproteína E •	ApoE	19q13	47, 48
Colágena tipo I $\alpha$ 1 •	COL1A1	17q22	49, 50, 51
Colágena tipo I $\alpha$ 2 •	COL1A2	7q22	50, 52, 53
Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1	19q13	54, 55, 56, 57
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF	4q21	58
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	7q22	59
Factor de estimulación de colonias de macrófagos	M-CSF	1p21-P13	60, 61
Glicoproteína $\alpha$ 2HS	AHSG	3q27	62, 63
Hormona paratifoidea •	PTH	11p15	64, 65
Interferón $\gamma$	INF- $\gamma$	12q14	61, 66
Interleucina 1	IL-1	2p13	61, 67
Interleucina 4	IL-4	5q31.1	68
Interleucina 6 •	IL-6	7p21	61, 68
Interleucina 11	IL-11	19q13.3-q13.4	67, 68
Interleucina 13	IL-13	5q31	67, 69
Osteocalcina •	BGLAP	1q25	70
Osteonectina	SPOCK	5q31	71
Osteopontina	SPP1	4q21	70, 71
Receptor de sensible a Calcio	CASR	3q21-24	72, 73
Receptor de Calcitonina •	CALCAR	7q21.3	74, 75
Receptor de Estrógeno $\alpha$ •	ESR $\alpha$	6q25.1	76, 51
Receptor de vitamina D •	VDR	12q13	76, 51
Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$	TGF- $\alpha$	2p13	67, 61

•Genes más ampliamente estudiados relacionados con OP.

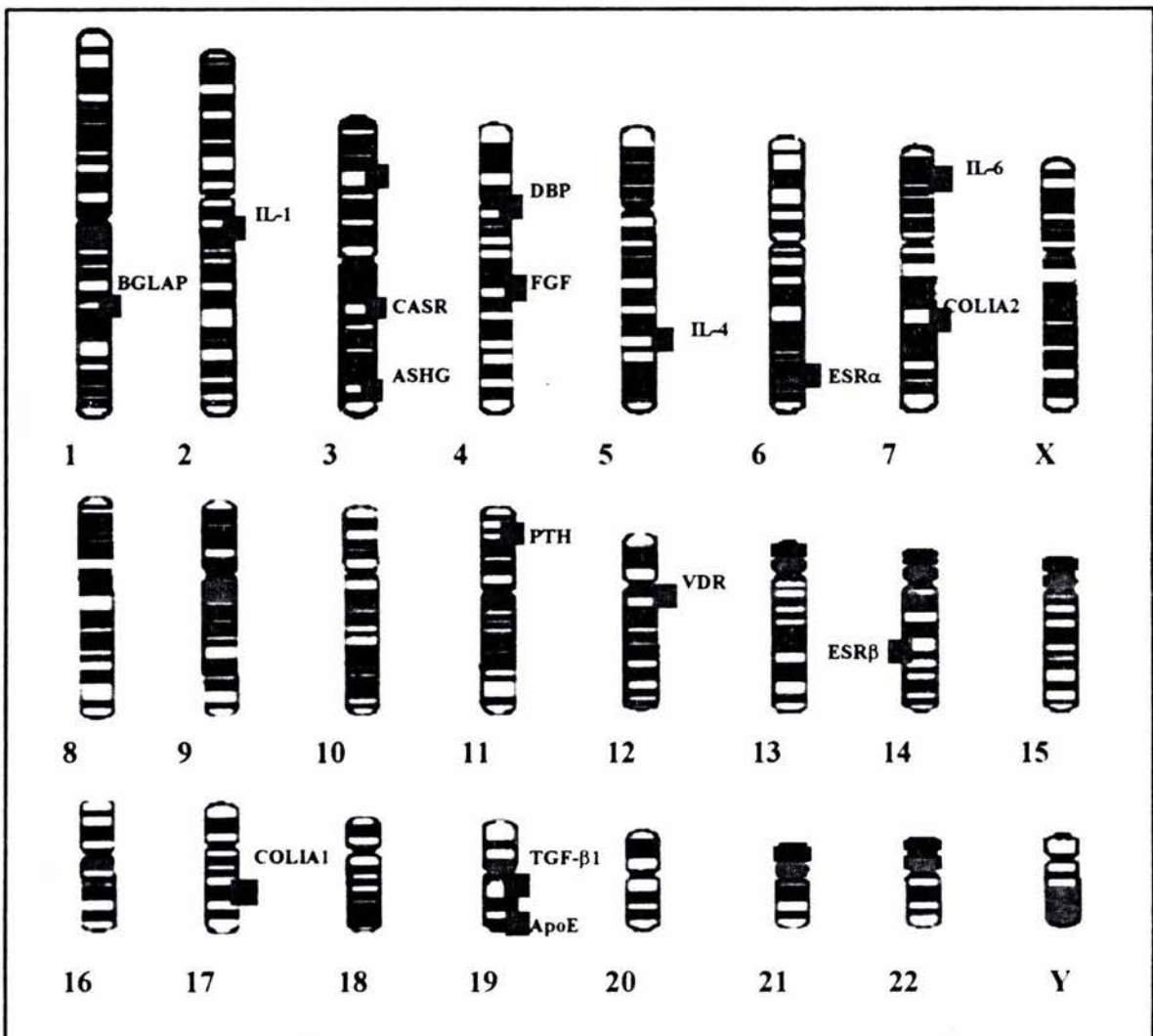
### Gen ESR $\alpha$

El gen del receptor de estrógeno (ESR $\alpha$ ) junto con los genes de COL1A1 y VDR representan los genes más estudiados con respecto al control genético de la DMO. Está bien establecido que la deficiencia de estrógenos en la postmenopausia juega un papel importante en la patogénesis de la osteoporosis, la cual está caracterizada por la pérdida patológica de masa ósea y el incremento en el riesgo de fractura. A pesar que la distribución del receptor es ubicua y se sabe que éste no sólo se encuentra presente en los osteoblastos sino también en los osteoclastos, evidencias que soportan los efectos directos del estrógeno en el metabolismo óseo.

Las tasas de pérdida de masa ósea y DMO en las mujeres postmenopáusicas va desde normal a rápida, sin embargo, esto no se relaciona únicamente con factores hormonales, ya que

estudios en gemelos sugieren cierta heredabilidad de la DMO, por lo que se piensa que la heterogeneidad de ésta y del metabolismo óseo pueden reflejar la variación genética, lo que puede determinar cierta responsabilidad de este gen en los niveles bajos de estrógeno, sin embargo hoy por hoy no se tienen los elementos suficientes para soportar esta hipótesis.<sup>3, 4, 42</sup>

El papel de la acción estrogénica sobre el metabolismo óseo se han investigado desde hace mucho tiempo. Diversos trabajos han correlacionado los niveles séricos de estradiol y la DMO, de esta manera, la pérdida postmenopáusica de estrógenos se ha asociado a la reducción de la DMO.



**Figura 5.** Localización cromosómica de algunos genes candidatos relacionados a la OP; el recuadro azul señala la región en cada cromosoma, donde se localizan estos genes, se muestran los genes más caracterizados y estudiados en relación con la OP.

*Gen ESR  $\beta$* 

De acuerdo a las características del Gen ESR  $\alpha$ , se piensa que la isoforma de éste, pueda influir de manera similar sobre el fenotipo óseo, debido a que se encuentra en número similar y en tejidos similares que el ESR  $\alpha$ , además se ha identificado que éste se encuentra presente tanto en osteoblastos como en los osteoclastos, evidencias que soportan los efectos directos del estrógeno en el metabolismo óseo. En la tabla 5 se encuentran los polimorfismos más estudiados, así como el polimorfismo de este trabajo de investigación, señalando las técnicas por los que han sido estudiados.

**TABLA 5. Genes más estudiados y técnicas por las que se desarrollo dicho estudio.**

LOCUS	Localización	POLIMORFISMO	ENZIMA	Técnica
ER $\alpha$ (AT)	6q25.1	STR (TA)		PCR y EC
Er $\beta$ (CA)	14q	STR (CA)		PCR y EC
ER-RFLP	6q25.1	RFLP	<i>Pvu II</i> <i>Xba I</i>	<i>RFLPs</i>
VDRH2	12q13	RFLP	<i>Taq I</i> <i>Bsm I</i>	<i>RFLPs</i>
VDR	12q13	RFLP	<i>Bsm I, Apa I</i> <i>Taq I</i>	<i>RFLPs</i>
CALCAR	17q21.3	RFLP	<i>Alu I</i>	<i>RFLPs</i>
APO E	19q13	STR (AACT)		PCR y EC

## 2.7 Polimorfismos génicos.

El hombre siempre se ha preocupado por establecer sus diferencias y caracterizarse con respecto a otras especies. Para ello, se ha valido de estudiar y analizar las diferencias como la morfología o fisiología de las especies o entre individuos, hoy en día esta diferenciación se lleva al cabo realizando diferentes métodos, en la investigación de su evolución a partir del DNA. No obstante la caracterización de cada individuo, se basa en múltiples marcadores o sistemas polimórficos que le confieren una identidad dentro de la misma especie.

Las variaciones genéticas que se presentan dentro de una población con una frecuencia mayor que la producida por una mutación recurrente, fueron definidas en 1940 por J. Ford como “Polimorfismos”.<sup>77</sup>

Algunos contienen cantidades variables de diferentes tipos de DNA altamente repetitivo. Se ha observado que no tienen repercusión sobre el fenotipo; sin embargo, datos en la literatura han reportado ampliamente que pueden tener un importante significado clínico.<sup>78</sup>

Con el paso del tiempo se ha observado que los sistemas polimórficos presentan ciertas propiedades, como son:

- Poseer un patrón hereditario bien definido.
- Ser estudiados con facilidad y utilizar para ello, una cantidad mínima de muestra.
- No ser afectados por agentes externos.
- Presentar variaciones significativas, en frecuencia, entre grupos raciales y entre poblaciones.
- El locus o región estudiada debe contener una gran variedad de alelos o secuencias alternativas.
- Detectarse desde el nacimiento, sin presentar variaciones durante la ontogenia..
- Deben ser selectivamente neutros.

Numerosos marcadores de DNA son altamente polimórficos y tienen la capacidad de revelar el genotipo sin el impedimento tradicional de el estudio del fenotipo como primer paso.<sup>79</sup>

El empleo de las diferentes metodologías que identifican las regiones polimórficas de cualquier individuo, constituyen una herramienta muy útil en el área de la genética clínica. En muchos casos, la variación entre ellos es discontinua y permite la identificación individual de cualquier sujeto dentro del linaje.<sup>80</sup>

La combinación del estudio de polimorfismos junto con marcadores bioquímicos reflejan una información muy completa para los estudios de ligamiento génico. Actualmente el estudio polimórfico ha tomado importante significancia clínica, como en los casos de Aneuploidías, en

Anomalías en el desarrollo, Retraso mental, Cáncer, en especial en tumores sólidos y leucemias, Corea de Huntington, en alergias, así como en otras enfermedades de mayor incidencia en la población mundial.<sup>77</sup>

Así mismo resultan útiles en el área de la medicina legal o forense en la identificación de cuerpos, así como en la investigación e identificación en el área de la criminalística.<sup>81</sup>

## **2.8 Estrategias para identificar los genes asociados a osteoporosis**

La principal herramienta en el estudio de genes asociados a OP, se realiza por medio de marcadores genéticos, ya que estos tienen la capacidad de identificar polimorfismos en los genes candidatos y relacionarlos con o sin la presencia de la patogénesis.

Como se ha podido observar, el polimorfismo que presentan ciertos genes se ha convertido en el antecedente para asociarlos a ellos o a sus formas alternativas con diferentes padecimientos. La búsqueda de uno o varios genes que puedan predecirnos una enfermedad es lo que se conoce como marcador genético, el cual tiene eficacia terapéutica debido que a través de él podemos diagnosticar de forma temprana un padecimiento.<sup>82</sup>

### **2.8.1 Marcadores de DNA.**

En este tiempo nos encontramos dentro de una revolución en genética molecular y biotecnología. Esta revolución, se desarrolla a pasos agigantados a partir del descubrimiento de el DNA recombinante y la utilización de la técnica de amplificación conocida como PCR. En la actualidad los marcadores de DNA son herramientas muy importantes en la evolución de la era del genoma o de la genética. Los marcadores genéticos deben presentar un amplio polimorfismo, con lo cual presentan la capacidad para discriminar a un individuo de otro (poder de discriminación **pD**), y con esto deben estar distribuidos en la población en una forma amplia. Así mismo, para que se puedan considerar eficientes deben de encontrarse ampliamente distribuidos en la población ( $HZ > 80\%$ ), y tener una baja probabilidad de coincidencia al azar (PCA), que se refiere a la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una población (salvo gemelos idénticos) tengan exactamente el mismo haplotipo.

Entre los marcadores altamente polimórficos se encuentran los SNP (single Nucleotide Polymorphism), los marcadores tipo microsatélite (STR=Short Tandem Repeat) que se caracterizan por ser regiones dispersas formadas por variables de 2 a 6 pares de bases repetidas en tandem, los marcadores tipo minisatélite (VNTR=Variable Number of Tandem Repeat) que se caracterizan por ser regiones dispersas formadas por variables de 15 a 70 pares de bases repetidas en tandem, y los marcadores de variación de secuencia. Estos pueden ser estudiados a través de las técnicas convencionales de biología molecular tales como: RFLPs (polimorfismo de longitud de fragmento por enzimas de restricción), SSCP (polimorfismo de conformación de cadena sencilla), ASO (hibridación alelo-específico de oligonucleótidos), y PCR (reacción en cadena de polimerasa), genotipificación a través de Gene Scan y secuenciación, entre otras.

Los alelos de los microsatélites de DNA varían uno del otro en el número de secuencias repetidas de dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y hasta hexanucleótidos, que son fácilmente distinguidos mediante electroforesis.

Mediante el uso de la PCR junto con los marcadores de DNA específicos, se logra la asignación de alelos sobre la base del tamaño del fragmento de DNA amplificado.

### **2.8.2 Minisatélites y Microsatélites.**

El análisis de secuencias polimórficas del DNA es una poderosa herramienta con un gran alcance para diferentes beneficios, muchos de los cuales se mencionan en el apartado 2.7. Los marcadores más informativos, descritos a la fecha, son los minisatélites (VNTRs), los cuales consisten en bloques de secuencias variables que se repiten en tándem, localizadas predominantemente en las regiones subteloméricas de los cromosomas y el tamaño del "core" es de 10 a 65bp.<sup>83 84 85</sup>

El alto polimorfismo de los VNTRs fue inicialmente detectado por medio de la técnica de "Southern Blot", las sondas mono-locus presentan de 1 a 2 bandas correspondientes a genotipos homocigotos o heterocigotos respectivamente y las sondas multi-locus detectan hasta 18 bandas por individuo. Al patrón de bandeado exclusivo para cada individuo se le conoce como "Huella digital del DNA o DNA Fingerprint".<sup>86, 87, 88</sup>

Sin embargo, para la detección de los minisatélites por la técnica de "Southern Blot" se requiere DNA de alto peso molecular y cuando menos 500ng del mismo, sin contar con el tiempo necesario para el análisis, por lo que es imposible emplearlos en casos en donde la muestra es escasa o se encuentra degradada. Para estos casos es necesario el empleo de marcadores que se amplifiquen por PCR, entre los que se encuentran los loci de variación de secuencia, los STR y algunos marcadores tipo VNTR para PCR.<sup>3</sup>

Los microsatélites o secuencias cortas de repetición en tándem (STR), al igual que los marcadores tipo VNTR son sistemas multialélicos altamente polimórficos, en los cuales el número de repeticiones en tándem es de 2 a 6pb. Estos marcadores se encuentran distribuidos en todo el genoma humano. A la fecha, se han descrito diferentes clases de loci para los microsatélites, estos incluyen di, tri, tetra, penta y hexanucleótidos<sup>(98,99,100)</sup>. El tamaño de los alelos de la mayoría de los loci STR se encuentran en el rango de 100 a 400pb, lo que les permite ser explorados fácilmente en muestras degradadas y escasas; además se pueden detectar fácilmente por técnicas sencillas como la electroforesis en poliacrilamida seguida de la tinción de plata y más recientemente haciendo uso de la electroforesis capilar (CE) en analizadores de DNA automáticos. La electroforesis en gel ha sido el método convencional para determinar el tamaño de los productos de PCR, sin embargo la técnica consume mucho tiempo y no es cuantitativa. La CE es una importante herramienta para este propósito, por que ofrece los beneficios de una separación rápida (24 min.) y eficiente de los fragmentos del DNA, empleando los principios de carga, hidrofobicidad, estereoespecificidad y tamaño.<sup>42, 94, 89, 90</sup>

Estos marcadores presentan grandes ventajas, ya que se encuentran en grandes cantidades, y relativamente espaciados a lo largo de todo el genoma, son importantes debido a que son más específicos, sobretodo en poblaciones con niveles bajos de variación de aloenzima y DNA mitocondrial (mtDNA).

Originalmente, estos marcadores se han utilizado para la realización de mapas genéticos y pueden ser usados de manera extensiva para la **Asociación de genes susceptibles en el desarrollo de diferentes enfermedades**. Además son usados para el análisis de paternidad y probabilidad de muestras de identidad entre individuos y en niveles poblacionales, en estudios de parentesco o afinidad, en estudios de **genética de población**, en estudios de hibridación entre



especies emparentadas, en la comparación de niveles de variación de especies y poblaciones ya que pueden proveer un uso para la valoración genética total, y estimar tamaños de población efectiva y migración entre subpoblaciones.<sup>93, 95, 91</sup>

### 2.8.3 SNPs

Los SNPs (single nucleotide polymorphism) es otro polimorfismo altamente prevalente en el genoma y con una alta variación genética, son variaciones de secuencias de DNA que ocurren cuando un mononucleótido (A, T, C o G) se encuentra cambiado o modificado en la secuencia genómica. Se sabe que la mayoría de estos cambios de 2 de cada 3 SNPs ocurren por el remplazamiento de citosina (C) por timina (T). Este tipo de marcadores ocurren cada 1000 a 2000 nucleótidos a lo largo del genoma humano, por lo que se estima que hay más de 3 millones en nuestro genoma, sin contar con la alta frecuencia y distribución en el mismo, lo que lo convierte en un marcador genético superior a cualquier otro y con capacidad para generar mapas de alta resolución.

Todos estos marcadores poseen la capacidad para ser buenos candidatos en el diagnóstico de enfermedades multigénicas, sin embargo, se requiere de estudios poblacionales con el fin de asociar determinados alelos a ciertas características de una determinada enfermedad, por lo que la rapidez con la que se realicen los estudios de asociación son el factor limitante para un oportuno diagnóstico.<sup>82</sup>

### 2.8.4 QTLs

Se conocen como loci de rasgos cuantitativos o genes en segregación de un rasgo cuantitativo. Es un método molecular relacionado con características cuantitativas medidas que pueden ser correlacionadas con la presencia o ausencia de un alelo de interés. Se definen como sistemas múltiples de genes en los que subyace la susceptibilidad de padecer determinadas enfermedades o adoptar ciertas pautas de comportamiento.

Usualmente éste es un marcador descrito por la asociación estadística de variaciones en características particulares de un fenotipo que puede ser controlado por la acción en conjunto de alelos en múltiples loci .

Este análisis se realiza en organismos experimentales mediante el cruzamiento de dos líneas que difieren notablemente en el rasgo cuantitativo y que difieren además en los alelos del loci bien conocidos, *genes marcadores*, donde los diferentes genotipos pueden distinguirse por criterios tales como un efecto fenotípico visible que es independiente del rasgo cuantitativo, por la movilidad electrfóretica de las proteínas que determinan o por la propia secuencia de DNA de los propios genes. La F1 procedente de las dos líneas se cruza entre sí misma para obtener una F2. Si existen QTL estrechamente ligados a un gen marcador, entonces los diferentes genotipos marcadores en la generación que segrega también contendrá los alelos QTL que están ligados a ellos en las líneas parentales originales. Por tanto, los diferentes genotipos marcadores en la F2 tendrán fenotipos medios distintos para el carácter cuantitativo. Desafortunadamente, en genética humana, aunque la segregación de genes marcadores puede emplearse para localizar desórdenes debidos a un único gen, el tamaño pequeño de los grupos de pedigríes humanos hace la técnica inaplicable a los loci de rasgos cuantitativos.<sup>92</sup>

## 2.9 Los polimorfismos del gen del receptor de estrógeno y la osteoporosis

Como mediadores de la acción hormonal de los estrógenos, los genes que codifican los ESRs tienen que ser considerados como importantes candidatos para la determinación de riesgo a la OP. Ya existen antecedentes de esta relación, aunque los primeros estudios se concentraron sólo en el ya conocido ESR $\alpha$ , donde se ha observado el fenotipo OP en un individuo que presentaba interrumpido el gen ESR $\alpha$ , así como en ratones en ausencia de este gen, por lo que se dice que es un gen responsable de la patogénesis. Esto es posible asegurarlo ya que las variantes alélicas de este gen causan diferencias importantes en la población general, siendo que a edad temprana no se observen secuelas importantes, por los altos niveles de estrógenos, pero al haber la descompensación de estos niveles, por alguna causa fisiológica o por el paso de la menopausia, estas secuelas se hacen observables desembocando en el desarrollo de la OP.<sup>9, 18, 93</sup>

94, 99

El primero de los receptores ESR $\alpha$ , se encuentra localizado en el cromosoma 6q25, en el cual se han identificado varios sitios polimórficos en la región promotora del gen, de tipo STR (TA)<sub>n</sub>, siendo asociadas con la variación de DMO en población Japonesa, según en este polimorfismo que se encontró en presencia de 12 TA repetidas, se relacionó con la disminución

de DMO. Este mismo grupo por medio de estudios con RFLP relacionó la ausencia del sitio de restricción Xba I y en presencia del sitio de restricción Pvu II en los que fueron observable la pérdida de DMO, y de la misma forma el aumento en el riesgo de OP.<sup>95, 96, 3, 97</sup>

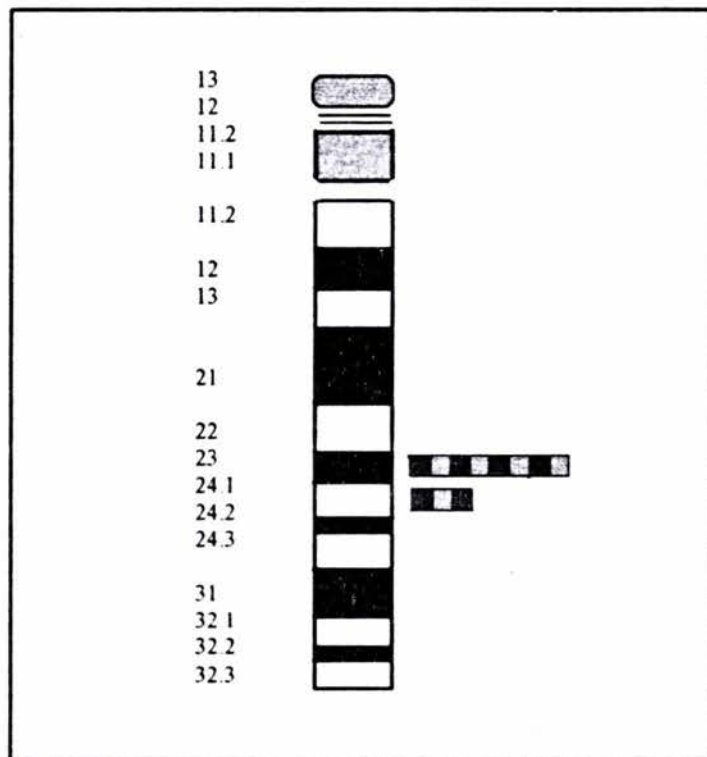
Con respecto a las variables en los sitios de restricción, fue el primer intento de asociarlo con la OP, pero en estudios realizados en poblaciones Belgas, Danesas, Italianas y Coreanas, no encontraron relación con la ausencia o presencia de Xba I o Pvu II RFLPs. Nuevos estudios en mujeres japonesas encontraron relación en ausencia de otro sitio de restricción, el Pvu II, el cual fue contradicho en estudios en mujeres Americanas y Británicas. De igual manera los resultados presentados en poblaciones Chinas tienen como resultado un aumento de la DMO, en lugar de una disminución. Los resultados obtenidos a lo largo del planeta, observaron una gran variabilidad, siendo que en ciertas regiones presentaban un comportamiento totalmente contrario al de otra región. Lo definitivo era que los mecanismos moleculares para los polimorfismo en Xba I y Pvu II en relación a riesgo de fractura no eran nada claros. A partir de este momento se buscó un desequilibrio en la región promotora del gen  $ER\alpha$ , encontrando el polimorfismo TA, ya antes observados por los Japoneses, pudiendo provocar influencia en la regulación transcripcional. Con esto se realizaron estudios en poblaciones Americanas, Italianas y Danesas, en las que se observaron relación entre el número de repetidas y la pérdida de DMO.<sup>22, 98, 99, 4, 100</sup>

Conociendo la relación de los polimorfismos en el gen  $ESR\alpha$  con respecto con la pérdida de DMO, es posible que se encuentren polimorfismos en el gen  $ESR\beta$ , recientemente descubierto en 1996, localizado en el cromosoma 14q22-24 (fig. 6), los cuales poseen una relación similar al  $ESR\alpha$ . Este gen se encuentra muy poco estudiado, ya que las investigaciones se encuentran en fase inicial. El primer estudio realizado en ratones  $ESR\beta$  Knockout sugiere un rol importante en la mediación entre la acción estrogénica y el crecimiento óseo, pero no asegura esta relación con la pérdida de DMO.<sup>99</sup>

En humanos, sólo se tienen como antecedentes 2 estudios, el primero realizado en mujeres premenopáusicas en población Japonesa en donde relacionan el polimorfismo dinucleótido (CA)<sub>n</sub> con la DMO. En la genética de población general se encontraron alelos cuyas repetidas van desde 18 a 32 repetidas (realizando su genética de población), mientras que en la población de estudio el alelo con 26 repetidas (alelo I) fue el que se encontró con mayor frecuencia, relacionado con un aumento en la DMO.

El segundo estudio fue realizado en mujeres premenopáusicas en población China en donde relacionan el mismo polimorfismo encontrado en la población japonesa, el dinucleótido (CA) $_n$  con la DMO, encontrando alelos que van desde 15 a 28 repetidas (realizando su genética de población) en individuos sanos, encontrando el alelo con 20 repetidas de CA, un aumento significativa en la DMO.<sup>101 102</sup>

Aún no se tienen claro la relación de este receptor con la OP, además de que no se tienen estudios donde se implique a éste con la patogénesis. Cabe mencionar que la función de ambos ESRs, es la misma, además de encontrarse presente en células osteoblásticas, como osteoclasticas por lo que es posible que la presencia de ciertos polimorfismos en el gen del ER $\beta$  puedan estar relacionados con la perdida de DMO en la OP.<sup>20</sup>



**Figura 6. Mapa de localización del ESR $\beta$  en el cromosoma 14. Identificación de el ESR $\beta$  en la región 14q22-24. Se ha encontrado en osteoblastos y en células progenitoras en la médula ósea, es homólogo al ESR $\alpha$  que se ha identificado en el brazo largo del cromosoma 6. Tomado de Mosselman et al.1996.<sup>16</sup>**

## 2.10 Utilidad de los polimorfismos genéticos en el diagnóstico de la osteoporosis

Se sabe que cada población se comporta de forma diferente, tal es así que los estudios realizados en poblaciones caucásicas manifiestan la enfermedad a partir de los 50 años, sin embargo, en otras poblaciones cada día es mayor el número de mujeres jóvenes (> 30 años) que presentan la enfermedad. Las poblaciones orientales, se han percatado de la importancia de un diagnóstico temprano, ya que puede permitir la prevención de la misma en las primeras fases de desarrollo (osteopenia). Tal es el impacto de este diagnóstico, que los grupos japoneses están realizando estudios de genética de población en mujeres muy jóvenes (15-23 años) y las estadísticas obtenidas indican que no se requiere la entrada al climaterio para que la enfermedad se manifieste.<sup>43, 44</sup>

La relación de polimorfismos en diferentes genes que puedan relacionarse con la patogénesis, puede desarrollar procedimientos preventivos de acuerdo a cada población.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

#### 3.1 Justificación.

En México la OP tiene una alta incidencia, presentándose en el 20% de las mujeres, mientras que cerca del 40% desarrollan osteopenia. Así mismo, el riesgo de que una mujer este predeterminada a sufrir fracturas por OP es muy alto, y equivale al riesgo combinado de desarrollar cáncer de mama, de útero y de ovario. Estudios realizados en nuestra población (n=4467 mujeres de 20 a 90 años) han indicado que la prevalencia de sufrir OP en una población de mujeres mayores a 50 años, aparentemente “sanas” sin factores de riesgo, es de 16%, mientras que algunos trabajos indican que la OP afecta a una de cada cinco mujeres de más de 45 años y a cuatro de diez de más de 70 años.<sup>1</sup> Según estimaciones del consejo nacional de población (CONAPO) para el año 2025 nuestra población estará integrada por 28 millones de hombres y mujeres mayores a 65 años, lo cual permitirá que un mayor número de personas padezcan OP, y con ello aumenten los riesgos de fracturas y por lo tanto de incapacidad.

Evidentemente, la atención requerida por los pacientes con OP repercute sobre la economía nacional, ya que por cada paciente con el Sector Salud gasta aproximadamente 60 mil pesos diarios, lo equivalente a 730 millones de dólares anuales, esto, sin tomar en cuenta la recuperación, en la cual se invierten cerca de 10 mil a 90 mil pesos<sup>1</sup>.

En México no contamos con los recursos económicos suficientes para ofrecer un tipo de atención especializada en pacientes con OP, por lo que resulta más conveniente prevenir que tratar las fracturas, las cuales tienen un elevado índice de incapacidad y de mortalidad. Para ello es necesario un estudio que nos permita detectar de forma eficaz y oportuna la presencia de la predisposición genética a esta enfermedad.

Así mismo, en nuestro país, no se cuentan con estudios de genética de población que nos permitan conocer la distribución de ciertos polimorfismos relacionados directa o indirectamente con la constitución y metabolismo óseo.

Pero para realizar un estudio en la población afectada, es necesario realizar previamente o de forma simultánea un estudio en la población en general, que nos permita conocer la distribución de estos alelos en nuestra población, lo cual nos servirá de control al comparar la distribución de los alelos en las poblaciones afectadas. Finalmente, conoceremos los alelos de mayor incidencia y asociaremos los diferentes genotipos al desarrollo de esta enfermedad. Esto nos permitirá no solamente conocer las características de este desorden en nuestra población, sino diseñar estrategias de prevención adecuadas a nuestras necesidades, ya que indudablemente el mejor tratamiento (y el menos costoso) de la OP es la prevención.

El estudio permitirá un diagnóstico temprano en aquellas mujeres con los alelos asociados a esta enfermedad y con ello una prevención oportuna.

## 3.2 Objetivos.

### 3.2.1 Objetivo General

Investigar las frecuencias alélica y genotípicas del polimorfismo microsatélite dinucleótido (CA) presente en el gen del receptor de estrógeno  $\beta$ , en un grupo de 150 individuos correspondientes a la población en general, en un grupo de mujeres mexicanas con y sin pérdida de la DMO, desarrollando en algunos casos osteopenia (n=29) y en otros OP (n=29). Así como relacionar posibles genotipos con la pérdida de DMO en el grupo de mujeres con OP y en el grupo de mujeres con osteopenia, empleando como control un grupo correspondiente de 29 mujeres sanas.

### 3.2.2. Objetivos particulares

1. Realizar una genética de población en un grupo de 150 individuos en general (300 cromosomas).

2. Investigar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos en el locus ER $\beta$  tanto en el grupo control (Población Normal), como en la población con OP, la población con osteopenia y en la población sana.

3. Calcular la heterocigocidad (HZ), el poder de discriminación (pD), la ley de Hardy-Weinberg, y la probabilidad de coincidencia al azar (PCA), verificando, así mismo la diversidad genética (índice de Shanon).

4. Investigar la asociación de cada uno de los genotipos del locus ER $\beta$  estudiados con respecto a la DMO en la población con OP y en la población con osteopenia.



## IV. METODOLOGÍA.

**DISEÑO METODOLÓGICO:** Investigación Biomédica, descriptiva, transversal y comparativa.

Registrado en el Departamento de Enseñanza del Instituto de Ortopedia del Centro Nacional de Rehabilitación.

### 4.1 Selección de Sujetos

Las muestras obtenidas (10 mL de muestras de sangre venosa a partir de la vena antecubital) se dividieron en cuatro grupos:

a) Genética de población para individuos mexicanos (población General):

- Se incluyeron muestras obtenidas de 150 voluntarios saludables (hombres y mujeres), con residencia a lo largo de toda la república Mexicana, los cuales deberían contar con una historia familiar, de por lo menos tres generaciones establecidas en la región a la que corresponden.
- Se les invitó a participar de manera voluntaria
- Se extrajeron 10 mL de sangre a partir de la vena cubital, lo cual representa un riesgo menor al mínimo, de acuerdo con la SSA.
- Se excluyeron aquellos casos en quienes no fue posible realizar el 100 % de los procesos requeridos en la investigación.

b) Población Sana:

- Se capturaron en la consulta externa de la clínica de OP del CNR 29 mujeres pre y postmenopáusicas (edad de 22-74 años, promedio 51.13 años, SD 13.8 +/-), con residencia en la Ciudad de México y zonas aledañas, con por lo menos tres generaciones de residencia en el D.F. o en el Estado de México.
- Se les invitó a participar de manera voluntaria en la investigación.
- Se extrajeron 10 mL de sangre a partir de la vena cubital, lo cual representa un riesgo menor al mínimo, de acuerdo con la SSA.
- Se les realizó un estudio de la medición de la DMO (cadera y columna), por medio del densitómetro Hologic QDR 2000 que pertenece a la unidad de rayos X del CNR.

- Los criterios de exclusión fueron cualquier mujer con deficiencia en su DMO, con uso de medicamentos que afecten el metabolismo óseo (como corticoesteroides, anticonvulsionantes, heparina), o historial ginecológico inusual, lo cual corresponde a aquellos casos en quienes no fue posible realizar el 100 % de los procesos requeridos en la investigación

c) Población con osteopenia:

- Se capturaron en la consulta externa de la clínica de OP del CNR 29 pacientes mujeres pre y postmenopáusicas (edad de 19-82 años, Promedio 59.7 años, SD 12.8+/-), las cuales presentaban disminución de DMO, con diagnóstico de Osteopenia. Con residencia en la Ciudad de México o zona conurbada.
- Se les invitó a participar de manera voluntaria en la investigación.
- Se extrajeron 10 mL de sangre a partir de la vena cubital, lo cual representa un riesgo menor al mínimo, de acuerdo con la SSA.
- Se les realizó un estudio de la medición de la DMO (cadera y columna), por medio del densitómetro Hologic QDR 2000 que pertenece a la unidad de rayos X del CNR.
- Como criterios de exclusión, cualquier individuo que presentara DMO normal o alta, así como pacientes con DMO disminuida por el posible uso de medicamentos que afectan el metabolismo óseo (como corticoesteroides, anticonvulsionantes, heparina), inusual historial ginecológico, así mismo, aquellos casos en quienes no fue posible realizar el 100 % de los procesos requeridos en la investigación

d) Población con OP:

- Se capturaron en la consulta externa de la clínica de OP del CNR 29 pacientes mujeres pre y postmenopáusicas, del CNR (edad de 26-82 años, Promedio 62.83 años, SD 11.5+/-), las cuales presentaban disminución de DMO, según los valores especificados por la OMS, (mujeres con una DMO por debajo de 2.5 DE con respecto a la media juvenil). Con residencia en la Ciudad de México o en el Estado de México.
- Se les invitó a participar de manera voluntaria en la investigación.

- Se extrajeron 10 mL de sangre a partir de la vena cubital, lo cual representa un riesgo menor al mínimo, de acuerdo con la SSA.
- Se les realizó un estudio de la medición de la DMO (cadera y columna), por medio del densitómetro Hologic QDR 2000 que pertenece a la unidad de rayos X del CNR.
- Como criterio de exclusión, cualquier individuo que presentara DMO por encima de 2.5 DE según la media juvenil, pacientes en uso de medicamentos que afecten el metabolismo óseo (como corticoesteroides, anticonvulsionantes, heparina), historial ginecológico inusual y aquellos casos en quienes no fue posible realizar el 100 % de los procesos requeridos en la investigación

#### **Definición Operativa de las variables de estudio:**

#### **4.2 Medición de la Densidad Mineral Ósea.**

Los parámetros evaluados son el contenido mineral óseo (BMC; g) y el área de densidad mineral ósea (aBMD; g/ cm<sup>2</sup>), los cuales son medidos en la columna (zona lumbar L1, L2, L3 y L4), y en el extremo proximal del fémur (cuello, región intertrocanterea y triángulo de Ward), así como los valores de z-score (relación sexo-edad-DMO), usando el método de absorciometría por rayos X de doble nivel de energía (densitometría ósea, DEXA; Hologic QDR 2000 + Hologic, Inc., Waltham, MA).

Según la OMS:

OP: DMO por debajo de 2.5 DE, con respecto a la media juvenil.

Osteopenia: DMO entre 1 y 2.5 por debajo de la DE, con respecto a la media juvenil.

Normal: hasta 1 DE con respecto a la media juvenil.

#### **4.3 Extracción de DNA.**

La extracción del DNA, se realizó a partir de 5 mL de sangre venosa, de cada uno de los individuos de cada población. Se empleó la técnica de Fenol/ Proteinasa K, descrita por Sambrook<sup>103</sup>.

- a) Extracción de 5 mL de sangre por medio de jeringa con aguja calibre 20 o 22, o bien por sistema Vacutainer, empleando EDTA como anticoagulante.
- b) Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos.
- c) Se tomó la fase que se encuentra entre los eritrocitos y el plasma (Leucocitos), por medio de una pipeta pasteur y se colocó en un tubo de 1.5mL.
- d) Se agregaron 500µL de Buffer de lisis de células (CLB) en frío y se homogenizó empleando un vortex.
- e) Se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos.
- f) Se decantó el sobrenadante, el botón se resuspendió con Buffer CLB frío y se homogenizó.
- g) Se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos.
- h) Se decantó y se adicionaron 500µL de Buffer de extracción y nuevamente se homogenizó.
- i) Se agregaron 20µL de Proteinasa K.
- j) Se incubó a 68°C, por 30 minutos.
- k) Se adicionaron 500µL de una solución, con una concentración 25:24:1 de fenol, cloroformo y Alcohol isoamílico.
- l) Se resuspendió y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos.
- m) Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo 1.5 mL.
- n) Se agregó una solución con una concentración 24:1 de Cloroformo: alcohol isoamílico.
- o) Se resuspendió y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos.
- p) Se tomó la fase acuosa, la cual se colocó en un tubo 1.5 mL y se agregó NaCl para obtener una concentración 0.2M.
- q) Se agregaron 500 µL de isopropanol frío.
- r) Se agitó el tubo con movimientos suaves de 180° hasta observar la formación de un paquete fibrilar.
- s) A través de una punta de una micropipeta se tomó el paquete con mucho cuidado y se colocó en un tubo de 1.5 mL con 1mL de etanol absoluto.
- t) Se resuspendió y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C.
- u) Se decantó y el botón se resuspendió en 1 mL de etanol al 70%.
- v) Se centrifugó a 1400rpm por 10 minutos a 4°C .
- w) Se decantó y se dejó secar el botón (DNA) a temperatura ambiente.

#### 4.4 Determinación espectrofotométrica de DNA.

- a) Al DNA seco se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.
- b) Por medio de una punta cortada se resuspende la muestra.
- c) Se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  y se llevó a 500  $\mu\text{L}$  con agua inyectable para alcanzar una dilución 1:100.
- d) La lectura se realizó mediante espectrofotometría a una  $\lambda=260$  y a  $\lambda= 280$ .
- e) Finalmente, se realizaron los cálculos para obtener la concentración total de dsDNA, tomando en cuenta que 1 D.O. dsDNA (densidad óptica de DNA de doble cadena)= 50 ng/mL.

Por lo tanto:

$$[\text{dsDNA}] = (1 \text{ D.O. } \lambda 260) (50\text{ng/mL}) (\text{Factor de dilución}).$$

Y la pureza del material genético, a través de la relación entre la  $\lambda=260$  y la  $\lambda= 280$ .

#### 4.5 Solución de DNA.

Según los datos obtenidos en la concentración total de dsDNA, se tomó una alícuota para preparar una solución de DNA que contenga una concentración final de 12.5ng/ $\mu\text{L}$  en 200  $\mu\text{L}$ .

#### 4.6 Locus analizado

**TABLA 6. Características del locus.**

LOCUS	Secuencia Polimórfica	Localización Cromosómica	No. Alelos reportados	Intervalo de repetidas
ESR $\beta$	(CA)n	14q22-24	13 (Chi)**	146-170**
			15 (Jap)*	150-178*

(CA)n; Polimorfismo dinucleótido citocina-adenina. Los alelos reportados son datos tomados de poblaciones Chinas y Japonesa. Tomados de Ogawa et. al 2000\* y Lau et. al 2002\*\*,<sup>101,102</sup>

#### 4.7 Determinación del polimorfismo microsatélite por PCR.

Este método emplea la técnica de PCR, la cual se basa en la amplificación de DNA *in vitro*. La región génica de interés se delimita con los primers específicos y se amplifica mediante una serie de cambios de temperatura: el primer paso es la desnaturalización del DNA por un incremento de temperatura (94°C); posteriormente hay una disminución de temperatura (25-65°C), lo cual permite la unión o alineamiento de los iniciadores a secuencias complementarias en el DNA; y finalmente hay un incremento de temperatura (alrededor de 72°C), donde la polimerasa termoestable de DNA empieza a copiar la secuencia en la hebra complementaria (uniendo nucleótidos trifosfato), a partir de las regiones donde se encuentran los iniciadores (Weising et al., 1995). Este esquema de cambios de temperatura se repite durante cierto número de ciclos lo que permite un incremento exponencial en el número de copias de moléculas de DNA que han sido amplificadas en cada ciclo. Así, a partir de pequeñas cantidades de DNA, se puede aumentar la concentración de ciertas regiones del genoma que pueden resultar informativas, en nuestro caso es la región del gen ESR $\beta$ .

La PCR fue realizada usando oligonucleótidos designados para amplificar las repeticiones polimórficas (CA) $n$  flanquendo la región del gen ER $\beta$  humano (fig.7.).

La reacción fue realizada en un volumen final de 6  $\mu$ L conteniendo:

- a) 2.5ng/ $\mu$ L de DNA genómico, obtenido de leucocitos en sangre periférica.
- b) 0.125  $\mu$ M de cada primer ( primer 1: TET 5'-GGTAAACCATGGTCTGTACC-3', primer 2: 5'-AACAAAATGTTGAATGAGTGGg-3') (Invitrogen)
- c) 200  $\mu$ M dNTP's.
- d) 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Roche).
- e) 0.6 $\mu$ L de 10X de reactivo Buffer. (Roche).
- f) 0.5 U de Taq DNA polimerasa. (Roche).

El procedimiento del termociclador (PE Biosystems, geneamp system 2400), se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 ciclos de hibridación de cebadores a 58°C por 15 segundos, y 30 ciclos de extensión del cebador a 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 10 minutos.



Cada gel se corrió en presencia de un marcador de peso molecular. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a concentración final de 0.5 µg/ml y posteriormente se fotografiaron.

#### 4.10. Análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar (CE).

La CE es una herramienta alternativa en el análisis de fragmentos de DNA, separándolos de acuerdo a sus pesos moleculares, a través de un capilar de un diámetro de 1 a 10 µm, corridos en comparación de un marcador de pesos moleculares. La detección del DNA migrado se realiza a través de una ventana por medio de fluorescencia inducida por laser (LIF) el cual disminuye los errores o variables que aparecen en una electroforesis común. Es un sistema automatizado que disminuye el tiempo de detección (24 min), teniendo una gran resolución, así como una fácil manipulación en el análisis de resultados, además de realizar el análisis con una pequeña cantidad del producto de PCR. En cada corrida el equipo de EC, realiza una curva patrón con los puntos del marcador TAMRA 500 y cuya  $\chi^2 < 1$ . Por medio de esta curva se obtienen el (los) peso(s) molecular(es) de cada alelo(s).

Se mezcló 1 µl del producto de cada PCR con 25 µl de una solución 74:1 de Formamida (desionizada) y el estándar de peso molecular (TAMRA™ 500 N° 401733; PE Biosystems). La muestra se analizó por electroforesis capilar mediante el Analizador Genético de DNA (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, PE Biosystems), empleando el polímero POP-4™ (N°. Cat. 402838; PE Biosystems) y el software Gene Scan V.2.01.

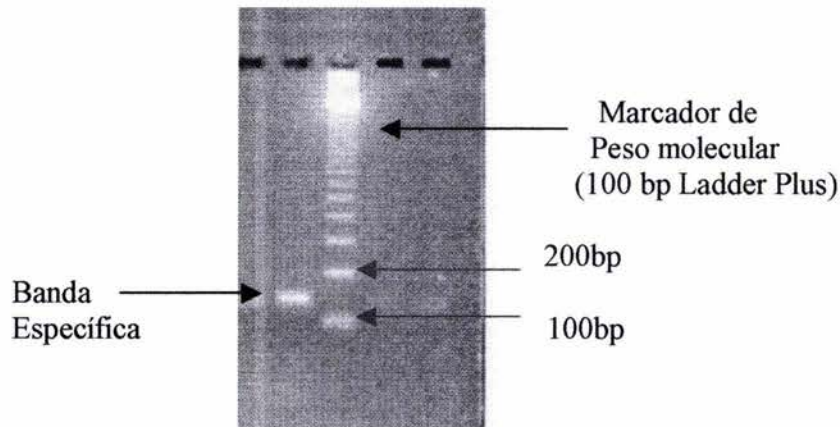
#### 4.11 Condiciones de Electroforesis Capilar (EC)

Las condiciones de separación de los fragmentos de DNA analizados se presentan en la tabla 8. Estas condiciones deben de manifestar de forma específica el producto de amplificación, el cual debe mantener el patrón característico que corresponda al tipo de polimorfismo. Así mismo, la cantidad del primer debe ser sólo la necesaria con el fin de que no introduzca ruido en la expresión del patrón polimórfico. Cada muestra se corre simultáneamente con el marcador de peso molecular (TAMRA 500), este marcador genera una serie de picos (fig. 9), los cuales son tomados como puntos para la realización de una curva patrón (fig. 10), que sirve para identificar el peso molecular específico de cada alelo.



#### 4.8 Condiciones de Amplificación Estandarizadas.

Las amplificaciones de los fragmentos de DNA, se realizaron en un termociclador 2400 (Applied Biosystems™). El producto de amplificación (locus ESR $\beta$ ) se encuentra localizado entre 150bp y 200bp<sup>11, 12</sup> (fig. 8), lo cual corresponde al peso molecular reportado por *Ogawa et. al. 2000*.<sup>101</sup>



*Figura 8. Amplificación de DNA en Gel de Agarosa al 3%*

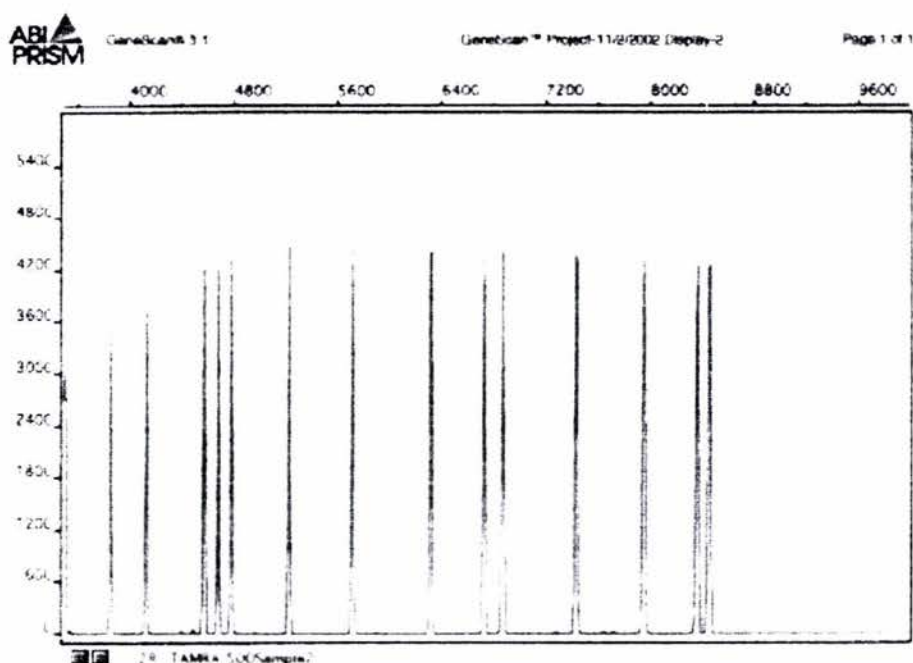
#### 4.9 Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel es uno de los métodos más resolutivos y convenientes empleados en la separación de DNA, el gel de agarosa posee poros de dimensiones moleculares, por lo que las separaciones moleculares se basan, por tanto, sobre la filtración en gel así como en las movilidades electroforéticas de las moléculas que se están separando. La separación se da por la inducción de una corriente, con lo que la separación de fragmentos se produce de cátodo a ánodo. El marcaje del DNA se realiza por medio de bromuro de etidio el cual es un intercalante entre dos bases y emite fluorescencia en presencia de luz UV, la cual es proporcional a la masa total de DNA.

El DNA obtenido de la sangre fue corrido en un gel de agarosa al 0.8%. Al término de las reacciones de PCR, los tubos se guardaron a 4°C. A cada tubo se le agregaron 2.5 $\mu$ l de marcador 6X(ficoll 400, azul de bromofenol en TE pH 8.0) y posteriormente se analizaron los productos de reacción en geles de agarosa al 3%. Se realizó las electroforesis a 100 V (en buffer TBE 0.5 X) hasta que el colorante alcanzó el final del gel.

**TABLA 8. Condiciones de Amplificación**

Temperatura	60°C
Tiempo de inyección	2 segundos
Tiempo de corrida	24 minutos
Inyección	15 KV
Corrida	15 KV

**Figura 9. Marcador de peso molecular TAMRA 500**

#### 4.12. Validación del método.

Para cada población, se agruparon los pesos moleculares de cada alelo de toda la población estudiada y se calculó la media y desviación estándar (ver Anexo 1). La asignación final del alelo para cada individuo se asignó de acuerdo a la media encontrada en el análisis poblacional  $\pm 0.5$  bases. Posteriormente, para cada locus analizado, se calculó la frecuencia alélica, genotípica, así como el número de individuos homocigotos y heterocigotos. La frecuencia alélica relativa, se determinó sumando el número de alelos iguales y dividiendo este número entre el número total de cromosomas analizados:  $n=300$  para la población general,  $n=58$  para la población con osteopenia,  $n=58$  para la población con OP y  $n=58$  para el grupo control.

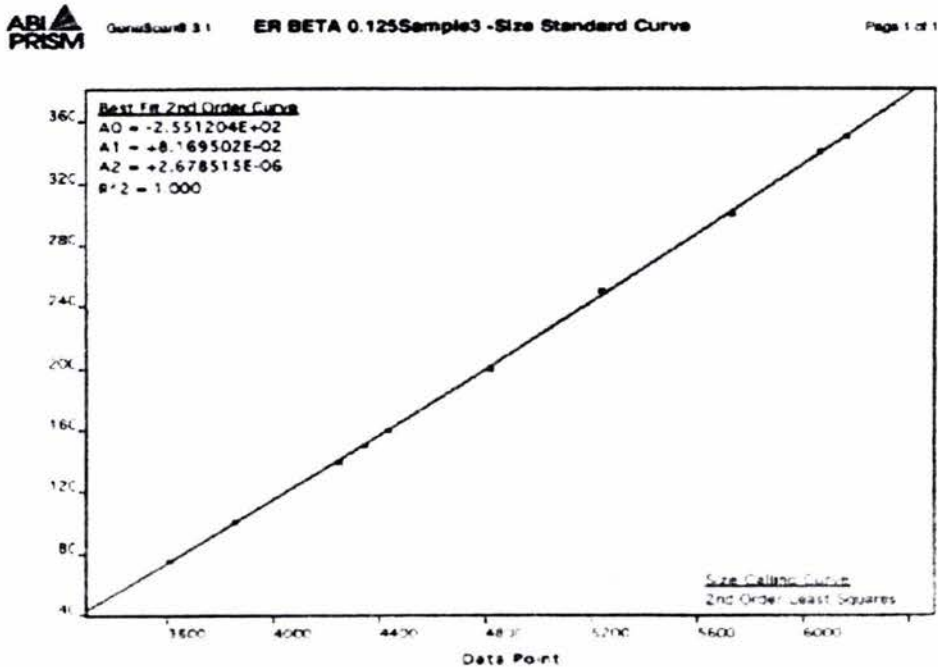


Figura 10. Curva patrón de pesos moleculares de TAMRA 500.

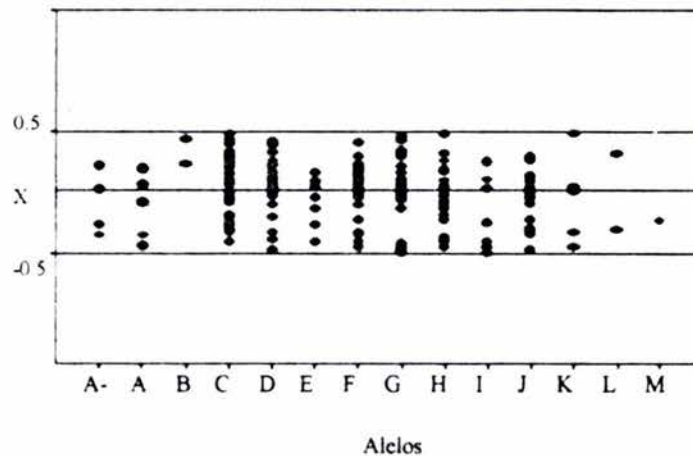
La heterocigocidad (HZ), el pD, la PCA, la ley de Hardy-Weinberg, así como el Índice de Shannon fueron calculados a través del programa POPGEN32 V. 1.31 (desarrollado por Francis Yeh, Rong-cai Yang y Timothy Boyle), dichos cálculos están de acuerdo a las siguientes fórmulas:  $HZ = (1 - \sum X_i^2) / (n - 1)$ , donde  $\sum X_i^2$  es la suma del cuadrado de las frecuencias alélicas relativas y n el tamaño de la muestra (número total de alelos posibles). La frecuencia genotípica relativa se determinó, sumando el número de genotipos iguales (2 alelos por individuo) y dividiendo este número entre el número total de genotipos analizados. Del mismo modo, se calculó la frecuencia de genotipos homo y heterocigotos.

La frecuencia genotípica esperada, se calculó de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg:  $[(X_1 + X_2 + \dots + X_n)^2 = X_1^2 + 2X_1X_2 + X_2^2 + \dots + 2X_1X_n + 2X_2X_n + \dots + X_n^2 = 1\Sigma]$ , donde  $X_1, X_2, \dots, X_n$  son las frecuencias alélicas. La frecuencia esperada de los genotipos homocigotos ( $H_o$ ) y heterocigotos ( $H_e$ ) de acuerdo con el equilibrio Hardy-Weinberg, fue calculada como sigue:  $H_o = \sum X_i^2$  y  $H_e = 1 - H_o$ , donde  $X_i$  es la frecuencia relativa de cada alelo. La significancia estadística entre los alelos y genotipos observados estimó mediante la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ), mediante el empleo del programa EPIINFO.<sup>91</sup>

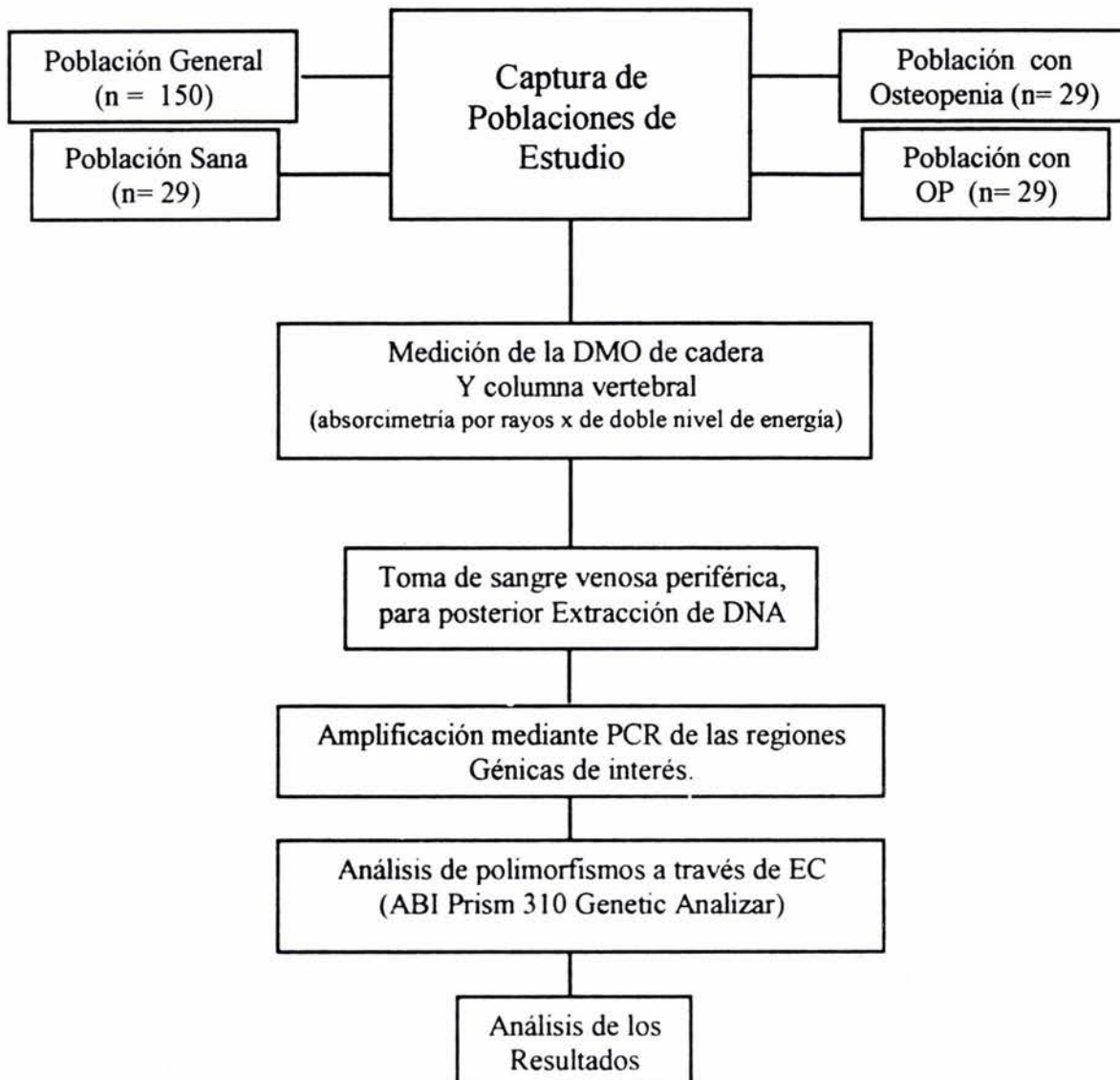
Finalmente, la PCA entre los genotipos de los individuos para un marcador dado, se calculó con la siguiente fórmula:  $PCA=q^2(2-q)$  donde  $q$  representa la frecuencia alélica media.

La figura 11 muestra la dispersión encontrada con los 300 alelos pertenecientes a la población general. Se puede observar que la dispersión no supera los  $\pm 0.5$  bases, por lo que para la asignación de los alelos se consideró la media  $\pm 0.5$  bases.

Los pesos moleculares obtenidos para cada alelo, de los individuos de cada población se encuentran especificadas en el anexo 1.



**Figura 11.** *Dispersión (bases) de los pesos de los alelos de las muestras analizadas para la población General. En el eje de las abscisas (x) se muestran los alelos específicos encontrados en la población general, cada alelo tiene un intervalo específico en el número de repetidas (véase tabla 12); mientras que en el eje de las ordenadas (y) se muestran las desviaciones estándar (DE), representando  $\pm 0.5$  pares de bases, donde  $\bar{x}$  es la media.*

**4.13 Diagrama Experimental.**

V. RESULTADOS.

5.1 Valoración de la DMO

En las tablas 9, 10 y 11 se encuentran registrados los valores obtenidos a partir de la valoración de la DMO, realizados a través del densitómetro Hologic QDR 2000, de la unidad de rayos X del CNR.

*TABLA 9. Valores densitométricos para la población normal.*

MUESTRA	GENOTIPO	EDAD	CADERA		COLUMNA		DX
			GANANCIA	Z SCORE	GANANCIA	Z SCORE	
1	CG	64	4	1.63	-14	0.41	Normal
2	BH	50	Nd	nd	-9	-0.19	Normal
3	DH	48	Nd	nd	20	2.51	Normal
4	CH	50	Nd	nd	10	1.74	Normal
5	GH	48	18	1.6	14	1.94	Normal
6	FG	40	11	3.1	30	3.1	Normal
7	AG	63	-7	0.56	-10	0.69	Normal
8	A-F	69	-12	0.54	-7	1.37	Normal
9	GI	65	-3	0.9	-13	0.48	Normal
10	CJ	24	15	1.95	3	0.29	Normal
11	EH	28	19	4.51	15	1.44	Normal
12	CH	73	Nd	nd	9	1.42	Normal
13	BC	40	Nd	nd	11	1.27	Normal
14	BC	60	6	1.38	-14	0.01	Normal
15	FG	59	Nd	nd	2	1.18	Normal
16	CF	53	Nd	nd	3	0.67	Normal
17	FG	52	8	1.83	7	0.3	Normal
18	A-C	51	8	0.27	Nd	nd	Normal
19	GG	22	Nd	nd	-2	-0.85	Normal
20	FG	29	5	0.28	-10	-1.03	Normal
21	CD	53	1	0.09	13	1.15	Normal
22	FG	38	24	1.76	25	2.54	Normal
23	FF	45	-1	-0.43	4	0.21	Normal
24	CF	56	25	2.58	10	2.1	Normal
25	A-F	52	15	2.33	Nd	nd	Normal
26	HH	70	-2	1.45	Nd	nd	Normal
27	CI	61	-4	1.12	4	1.29	Normal
28	GG	46	-5	0.07	Nd	nd	Normal
29	CJ	74	-2	2.13	2	2.13	Normal

*Se observa el genotipo, la edad y los valores de ganancia de DMO, así como los valores de Z Score tanto para cadera como para columna.*

TABLA 10. Valores densitométricos para la población OP.

MUESTRA	GENOTIPO	EDAD	CADERA		COLUMNA		DX
			PÉRDIDA	Z SCORE	PÉRDIDA	Z SCORE	
1	CH	26	44	-3.01	30	-2.83	OP
2	CD	49	8	-0.17	34	-2.4	OP
3	A-G	62	33	-1.34	39	-2.1	OP
4	FG	54	33	-1.61	31	-1.87	OP
5	IJ	68	46	-1.92	34	-1.23	OP
6	FJ	67	Nd	nd	29	-0.82	OP
7	SS	63	18	-0.22	25	-0.74	OP
8	CD	70	Nd	nd	29	-0.63	OP
9	GH	58	Nd	nd	31	-1.63	OP
10	GH	56	30	-1.31	39	-2.58	OP
11	GG	75	26	-0.06	38	-1.24	OP
12	GH	80	36	-0.47	17	1.09	OP
13	GH	77	41	-0.99	27	0.02	OP
14	GH	65	34	-1.33	49	-2.87	OP
15	FG	73	Nd	nd	30	-0.61	OP
16	CC	57	44	-2.33	20	-0.69	OP
17	CI	77	Nd	nd	32	-0.51	OP
18	CF	70	Nd	nd	31	-0.83	OP
19	CF	54	Nd	nd	39	-2.71	OP
20	DD	56	Nd	nd	40	-2.66	OP
21	EF	72	Nd	nd	33	-0.93	OP
22	FG	54	30	-1.42	Nd	nd	OP
23	FG	62	Nd	nd	42	-2.38	OP
24	GH	59	Nd	nd	36	-2.06	OP
25	EF	82	Nd	nd	41	-1.1	OP
26	CD	61	Nd	nd	40	-2.34	OP
27	FJ	50	16	-0.71	33	-2.31	OP
28	DJ	56	18	-0.5	37	-2.32	OP
29	GJ	74	42	-1.28	31	-0.62	OP
30	FK	58	Nd	nd	27	-1.33	OP

Se observa el genotipo, la edad y los valores de pérdida de DMO, así como los valores de Z Score tanto para cadera como para columna.

Para la población sana, se encontraron valores de entre 22 a 71 años de edad, teniendo como promedio de la población 51.13 años de edad, teniendo valores de Z Score como determina los patrones de la OMS y con valores estandarizados para una población latinoamericana. Para la población OP, se encontraron valores de entre 26 a 82 años de edad, teniendo como promedio de la población 62.83 años de edad, conforme a los valores de Z Score determinados por la OMS y con valores estandarizados para una población latinoamericana.

Por último, para la población con Osteopenia, se encontraron valores de entre 19 a 79 años de edad, teniendo como promedio de la población 59.7 años de edad, teniendo valores de Z Score como determina los patrones de la OMS y con valores estandarizados para una población latinoamericana.

*TABLA 11. Valores densitométricos para la población con Osteopenia.*

MUESTRA	GENOTIPO	EDAD	CADERA		COLUMNA		DX
			PÉRDIDA	Z SCORE	PÉRDIDA	Z SCORE	
1	DF	19	18	Nd	23	-2	ON
2	NQ	36	19	-1.38	19	-2	ON
3	CJ	31	21	-1.47	9	-1	ON
4	DK	30	12	-0.8	18	-2	ON
5	CH	49	28	-1.67	24	-2	ON
6	A-G	50	Nd	nd	17	-1	ON
7	FG	59	Nd	nd	16	-0	ON
8	GG	51	-2	0.64	23	-1	ON
9	FG	56	10	0.07	21	-1	ON
10	DH	52	20	-0.8	8	0.1	ON
11	AF	53	1	0.58	18	-1	ON
12	FG	53	Nd	nd	19	-1	ON
13	FG	53	Nd	nd	22	-1	ON
14	DH	57	17	-0.39	26	-1	ON
15	EF	52	Nd	nd	13	-0	ON
16	BD	58	9	0.22	20	-1	ON
17	GH	50	Nd	nd	22	-1	ON
18	CG	64	4	0.79	14	0.4	ON
19	CC	62	25	-0.78	22	-1	ON
20	GI	65	3	0.9	14	0.5	ON
21	BC	60	-6	1.38	15	0	ON
22	FH	63	22	-0.61	10	0.7	UN
23	CF	76	16	0.69	24	0.2	ON
24	CG	70	Nd	nd	26	-0	ON
25	GH	74	Nd	nd	22	0.3	ON
26	FG	70	20	0.07	24	-0	ON
27	DG	70	Nd	nd	12	1	ON
28	CF	79	28	0.01	21	0.7	ON
29	GH	71	19	0.16	21	0.2	ON

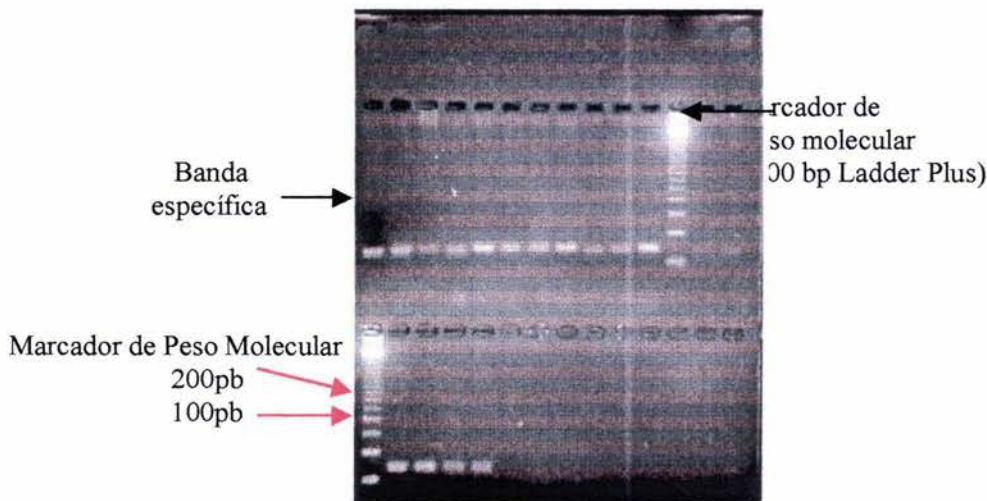
*Se observa el genotipo, la edad y los valores de pérdida de DMO, así como los valores de Z Score tanto para cadera como para columna.*



## 5.2 Frecuencias Alélicas.

De los individuos pertenecientes a cada población (Población general n=300 alelos, Población Normal n=58 alelos, Población Osteopénica n=82 alelos y la Población OP n=58 alelos) se obtuvieron las frecuencias de distribución alélica. Los fragmentos de amplificación fueron corroborados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3% (fig. 12), mientras que los pesos moleculares se obtuvieron por EC (fig. 13) y estos se encuentran (ver tabla 12) entre de 148bp (17 repetidas CA) a 186 bp ( 36 repetidas CA) .

Las frecuencias observadas muestran que la distribución de los alelos es diferente para cada población, por lo que muchos de los alelos reportados desaparecen de una población a otra, mientras otros como los alelos C (20 repetidas), F (23 repetidas), G (24 repetidas) y H (25 repetidas) se presentaron en las 4 poblaciones estudiadas (Tabla 13 y figura 14 y 15).



**Figura 12.** PCR de diferentes individuos empleando los primers para ESR $\beta$ . Se observa la banda específica que varía entre 150 y 190pb, entre diferentes individuos (Gel de Agarosa al 3%).

En la población general, se encontró un alelo no reportado el cual corresponde a 16 repetidas. Para la población OP y para la población con Osteopenia se encontraron la presencia de alelos con mayor número de repetidas (> 30) Q, S y N, S respectivamente, los cuales no se encuentran presentes en la población general, ni en la población Normal.

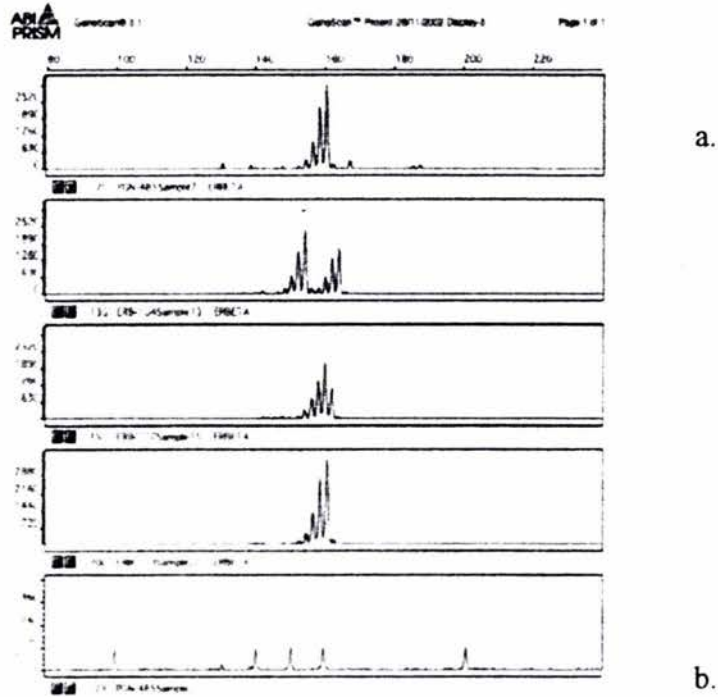


Figura 13. Electroferograma. Se ejemplifica los resultados mostrados en diferentes individuos concernientes a la misma población. a) alelos en diferentes individuos; b) marcador de PM.

TABLA 12. Secuencia polimórfica (CA)*n*, para el locus ESRβ

Alelos	Intervalo de repetidas (bp)	Número de reptidas
A--	146	16
A-	148	17
A	150	18
B	152	19
C	154	20
D	156	21
E	158	22
F	160	23
G	162	24
H	164	25
I	166	26
J	168	27
K	170	28
L	172	29
M	174	30
N	176	31
O	178	32
Q	182	33
S	183	34

Señala el intervalo de repetidas de los alelos encontrados en individuos mexicanos durante el proceso de la investigación.

*TABLA 13. Frecuencias de distribución alélica*

Alelos	P. General (%)	P. Normal (%)	P. OPenia (%)	P. OP (%)
A-(146)	1	0	0	0
A-(148)	2	5	2	2
A(150)	3	2	3	0
B(152)	1	5	2	0
C(154)	20	21	17	16
D(156)	9	3	10	10
E(158)	4	2	2	3
F(160)	17	19	21	19
G(162)	18	22	22	24
H(164)	11	14	12	12
I(166)	2	4	0	2
J (168)	8	4	3	7
K(170)	3	0	2	2
L(172)	1	0	0	0
M(174)	1	0	0	0
N(176)	0	0	2	0
O(178)	0	0	0	0
Q(182)	0	0	0	2
S(186)	0	0	2	2

*Porcentaje de los alelos encontrados en cada población; se observan que los alelos G, F, C, H, son los más frecuentes en las diferentes poblaciones.*

Con respecto a la comparación de las frecuencias alélicas de la población control con la población OP no se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) La tabla 14 muestra el porcentaje en que se presentan los alelos estudiados en otras poblaciones. Como puede observarse la nuestra población se comporta de forma muy similar a la China, sin embargo algunos alelos como el F y el G se encuentran en porcentajes mucho mayores (casi el doble) en nuestra población en comparación con la China. En la población Japonesa su frecuencia alélica va de un rango de 150- 178 bp, predominando el alelo E (25%), y el J (23%), en la China con alelos que van de un rango de 146 a 170 bp, predominando los alelos C (27%) y H (20%) y en la Población General Mexicana va de un rango de 146 a 174 bp, predominando los alelos C(20%), G (18%) y F (17%).

FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DE LA POBLACIÓN GENERAL

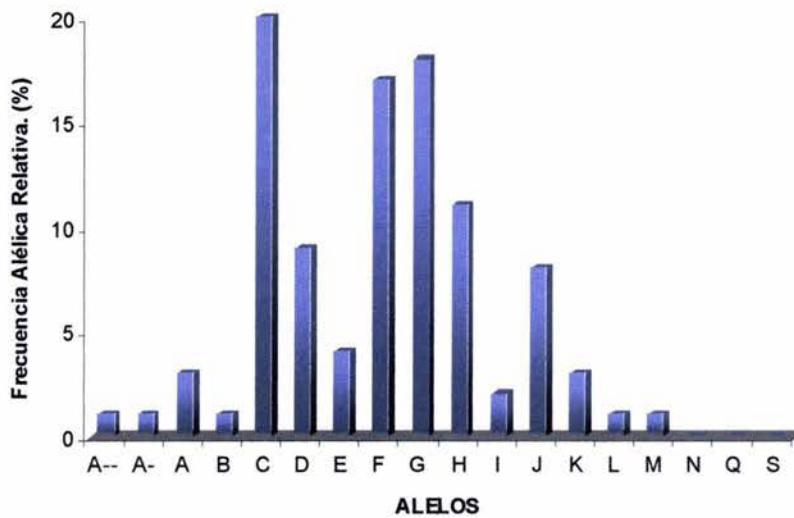


Figura 14. Frecuencias alélicas de la población General (300 alelos), siendo C, G y F los alelos más frecuentes

FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN ALÉLICA

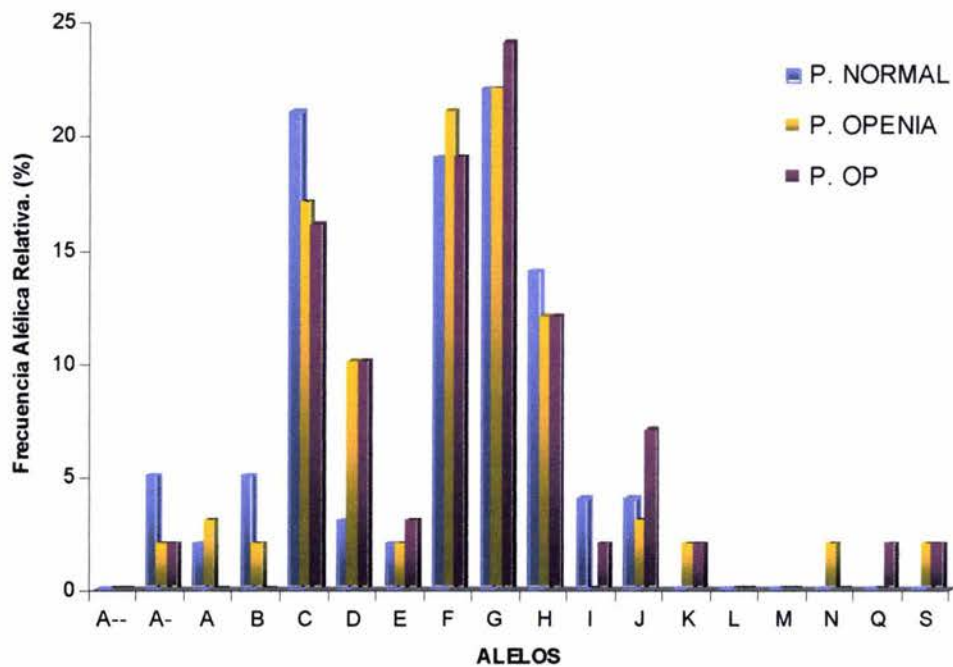


Figura 15. Comparación de la frecuencia alélica relativa entre las poblaciones con pérdida de DMO (OP y osteopenia) y la población normal.

*TABLA 14. Frecuencia alélica en diferentes poblaciones.*

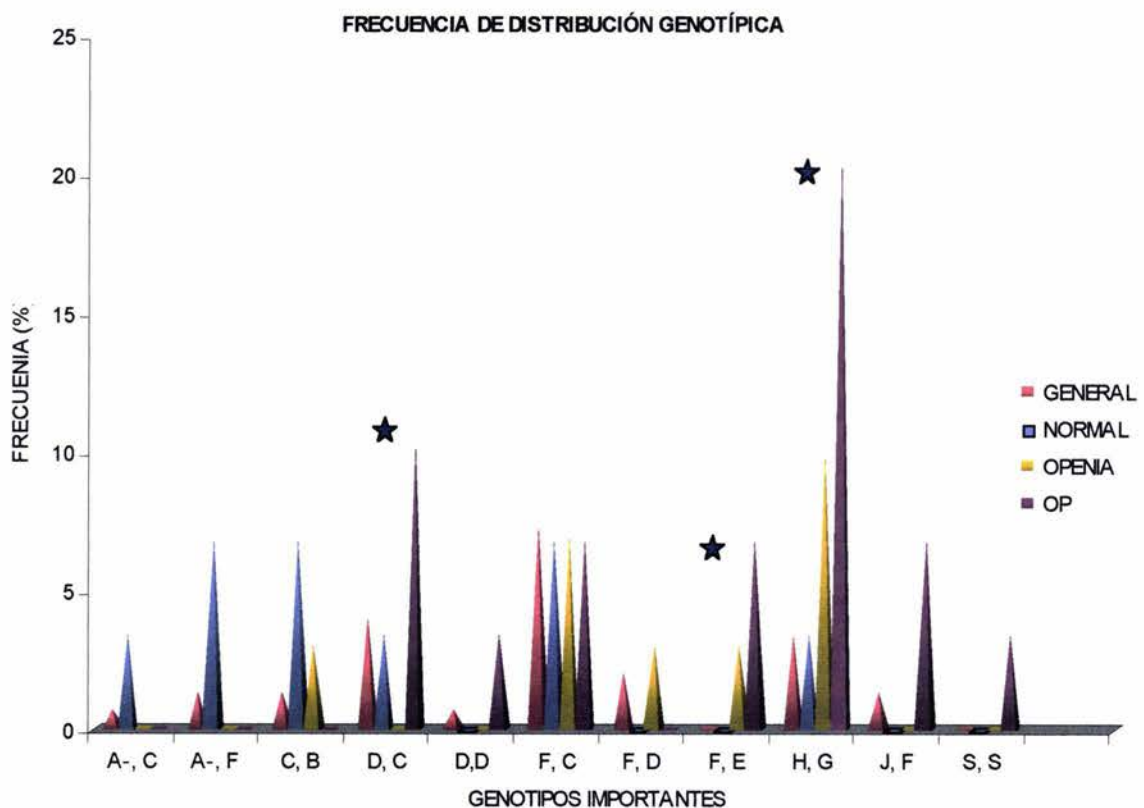
Alelos	P. Mexicana (%)	P.Mex/ OP (%)	P. Japonesa <sup>1</sup> (%)	P. China <sup>12</sup> (%)
A-- (146)	1	0	0	1
A- (148)	1	1	0	1
A (150)	3	1	2	2
B (152)	1	1	1	11
C (154)	20	16	1	27
D (156)	9	10	3	9
E (158)	4	3	25	6
F (160)	17	19	10	10
G (162)	18	23	6	10
H (164)	11	12	13	20
I (166)	2	2	14	5
J (168)	8	6	23	3
K (170)	3	1	15	2
L (172)	1	0	4	0
M (174)	1	0	2	0
N (176)	0	2	1	0
O (178)	0	0	1	0
Q (182)	0	1	0	0
S (186)	0	1	0	0

### 5.3 Frecuencias Genotípicas.

Las frecuencias de distribución genotípica para el locus estudiado para cada población, se comparan en la tabla 15 y en la figura 16 (ver anexo 2). Para la Población General se encontraron 50 genotipos (en combinación de 14 alelos diferentes), para la población control determinamos 19 genotipos (en combinación de 11 alelos diferentes), en la población con osteopenia se encontraron 25 genotipos (en combinación de 15 alelos diferentes) y finalmente, en la población con OP se determinaron 17 genotipos (en combinación de 12 alelos diferentes). En esta población se encontró un genotipo inexistente (genotipo EF) en las otras tres poblaciones estudiadas.

En la tabla 15, podemos observar que los genotipos más frecuentes para las poblaciones de estudio fueron: DC, GC y GF los cuales se presentan con una frecuencia  $\geq 10\%$ . Sin embargo la población OP y la población con osteopenia presentan un elevada frecuencia del genotipo GH (fig. 15), el cual está presente en el 20% de los pacientes con

OP y en el 7% de los pacientes con Osteopenia, mientras que en las poblaciones General y Normal sólo se presentan en un porcentaje  $\leq$  al 3%. El genotipo GH presentó una diferencia significativa ( $P= 0.045$ ), lo que hace suponer una posible asociación con la disminución de la DMO. De la misma forma el genotipo EF presentó una diferencia significativa ( $P= 0.0051$ ). Los genotipos DD, FE, JF y SS parecen ser característicos de las Poblaciones OP y Población con osteopenia.



**Figura 15. Genotipos más frecuentes.** Se comparan la frecuencia genotípica relativa en las cuatro poblaciones en estudio. La estrella muestra diferencias significativas entre los valores normales con los presentes en OP.

Así mismo en la tabla 15 parte inferior se presentan el número de homocigotos (Ho) y heterocigotos (He) observados para cada población analizada.

**TABLA 15. a) Genotipos más frecuentes encontrados en cada población.  
b) Homocigotos y Heterocigotos encontrados**

Genotipo	P. General (%)	P. Control (%)	P. OPenia (%)	P. OP (%)
A-, C	1	3	0	0
A-, F	1	7	0	0
C, B	1	7	3	0
D, C	4	3	0	10
D, D	1	0	0	3
F, C	7	7	7	7
F, D	2	0	7	0
F, E	0	0	3	7
H, G	3	3	3	21
J, F	1	0	0	7
S, S	0	0	0	3

	Población General	P. Normal	P. OPenia	P. OP
Homocigotos (Ho)	21	3	2	4
Heterocigotos (He)	129	26	27	25
Total de muestras	150	29	29	29

#### 5.4 Ley de Hardy-Weinberg.

A partir del número de homocigotos y heterocigotos observados, así como de los homocigotos y heterocigotos esperados se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual permite determinar si nuestras poblaciones se encuentran en equilibrio, esto es, que el apareamiento dentro de la población se dé al azar. En la tabla 16 se presentan los genotipos Homocigotos (Ho) y Heterocigotos (He) observados y esperados de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg. La frecuencia de los genotipos observada en cada población no difieren significativamente de la frecuencia calculada a partir de la ley de Hardy-Weinberg, lo cual indica que todas las poblaciones en estudio están en equilibrio genético.

#### 5.5 Diversidad genética.

Los alelos encontrados se compararon, con los alelos esperados según la ecuación de Kimura y Crow (1964), realizada por medio del programa Gene pop 32 (tabla 17), con esto se identificó una mayor cantidad de alelos encontrados, contra los que se hubiesen esperado, así mismo a través del mismo programa se calculó el Índice de Shannon con el

objeto de verificar si el polimorfismo estudiado es altamente polimórfico (tabla 17) y se realizó un dendograma (Nei 1978) que establece distancias genéticas para asegurar que la población OP, pertenece a la misma población que la Población general (fig. 17) y que no constituye un subgrupo de la misma, a partir de un número aleatorio inicial o neutro, que relaciona la Población General con la población OP (anexo 3). Los valores obtenidos son idénticos, lo que indica que la distancia genética es la misma.

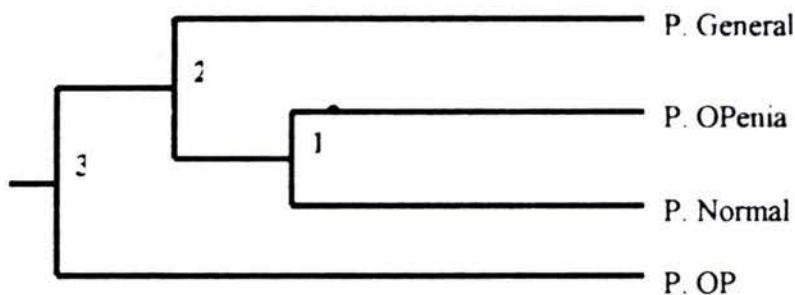
**TABLA 16. Equilibrio Hardy Weinberg.**

	Homocigotos		Heterocigotos		n	$\chi^2$ P
	OBESERVADOS	ESPERADOS	OBSERVADOS	ESPERADOS		
POB. GENE	21	19	129	131	150	0.7345
POB. SANA	3	4	26	25	29	0.6894
POB. OPENIA	2	4	27	25	21	0.3885
POB. OP	4	4	25	25	29	1

**TABLA 17. Diversidad genética y polimórfica.**

<u>DIVERSIDAD GENÉTICA (ÍNDICE DE SHANNON'S)</u>	
POB GENE	2.2175
POB SANA	2.0445
POB. OPENIA	2.1064
POB. OP	2.0641

Basado en la Diversidad Genética de Kimura and Crow 1964, muestra que tan polimórfico son cada población.



	Pob. General	Pob. Normal	Pob. Openia	Pob. OP
Pob. General	0	0.9563	0.9723	0.9681
Pob. Normal	0.0445	0	0.9637	0.9502
Pob. Openia	0.0281	0.0370	0	0.9804
Pob. OP	0.0324	0.0511	0.0198	0

**Figura 17. Dendograma (distancias genéticas) según establece Nei, 1978.**



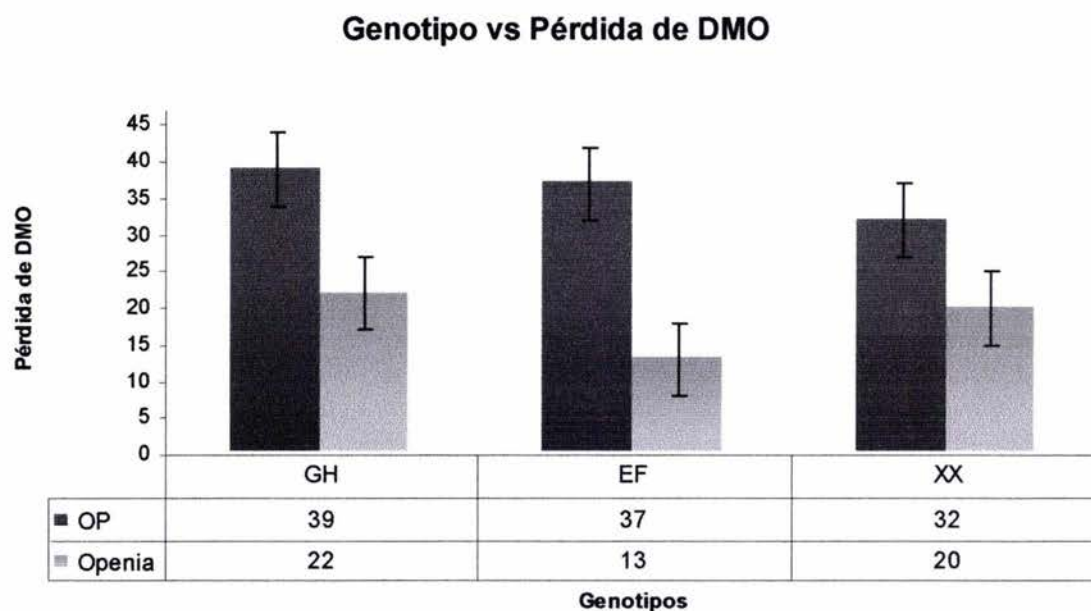
### **5.6 Correlaciones entre Genotipos y DMO.**

En la figura 18 se muestra la relación entre genotipos y la pérdida de DMO en columna vertebral realizado tanto en los 29 pacientes con OP, como en los 29 pacientes con osteopenia. En la figura 19, también se compara la relación entre genotipos y el Zscore en columna vertebral, tanto en la población OP, como en la población con osteopenia. En ambas figuras, se comparan el genotipo GH y el genotipo EF con respecto al promedio de los demás genotipos (XX), ya que estos dos genotipos fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre la población normal y la población OP. Como se puede observar en la figura 18 los Genotipos GH y EF se encuentran relacionados con la mayor pérdida de DMO en comparación a las demás poblaciones, sin embargo, en la población con osteopenia, EF no presenta una pérdida de DMO mayor que XX.

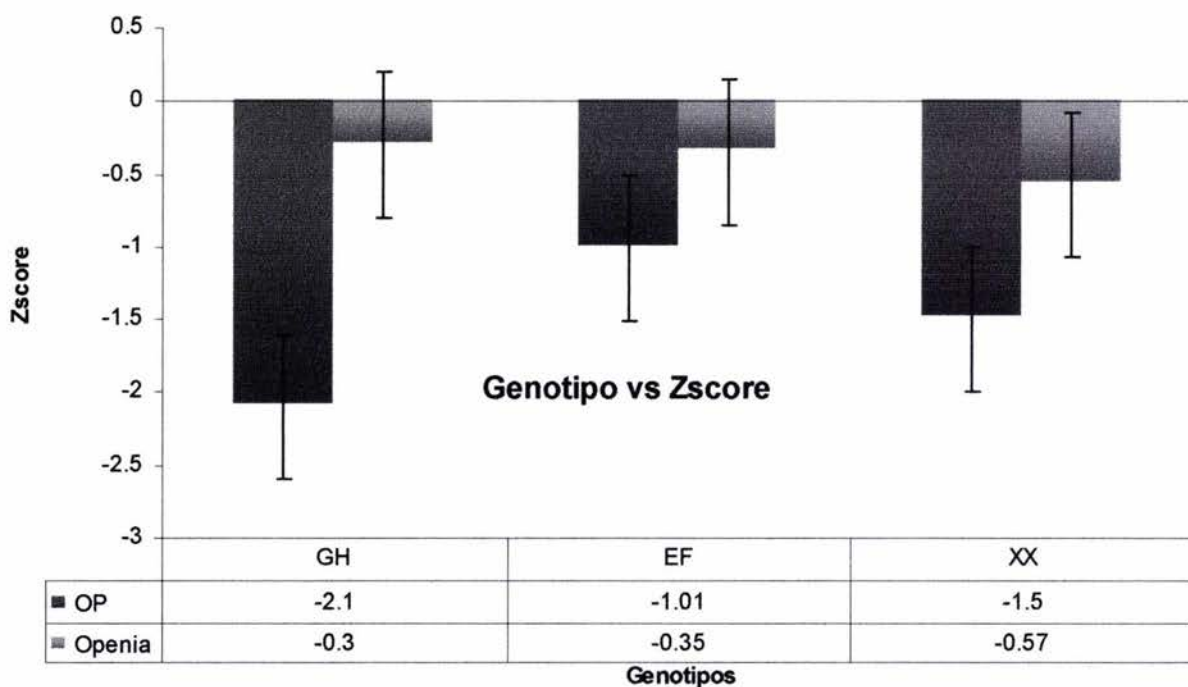
La figura 19 muestra que el genotipo GH es el que tiene un Zscore mas negativo en la población con OP (cabe mencionar, que los valores de Z score mas negativos o menores, están relacionados con una pérdida mayor de la DMO en relación a otros parámetros anteriormente explicados), lo que nos dice, que es el genotipo más altamente relacionado a la perdida de DMO. Mientras que para el genotipo EF, no se muestra tan clara esta suposición, ya que el Zscore que presenta, no es menor que el de las demás poblaciones.

La columna vertebral es la zona más afectada en el proceso de la patogénesis. En la figura 20 se compara el Zscore, para valores de cadera y columna vertebral de el genotipo GH en comparación a XX, está figura muestra que GH desarrolla una mayor pDMO en columna vertebral que en comparación a la cadera, afectando de manera considerable a la zona lumbar, la cual tiene un mayor descenso de su DMO en la población mexicana.

En la figura 21 se observa el patrón electroforético obtenido en la identificación del genotipo GH, el cual parece estar relacionado con la pérdida de DMO.



*Fig 18. Valores de pérdida de DMO de columna que poseen genotipo GH, genotipo EF y los demás genotipos (XX)*



*Fig 19. Se muestran los valores de Zscore de DMO de columna que poseen genotipo GH, y los que presentan el genotipo EF y XX*

Genotipo vs Zscore (P. OP)

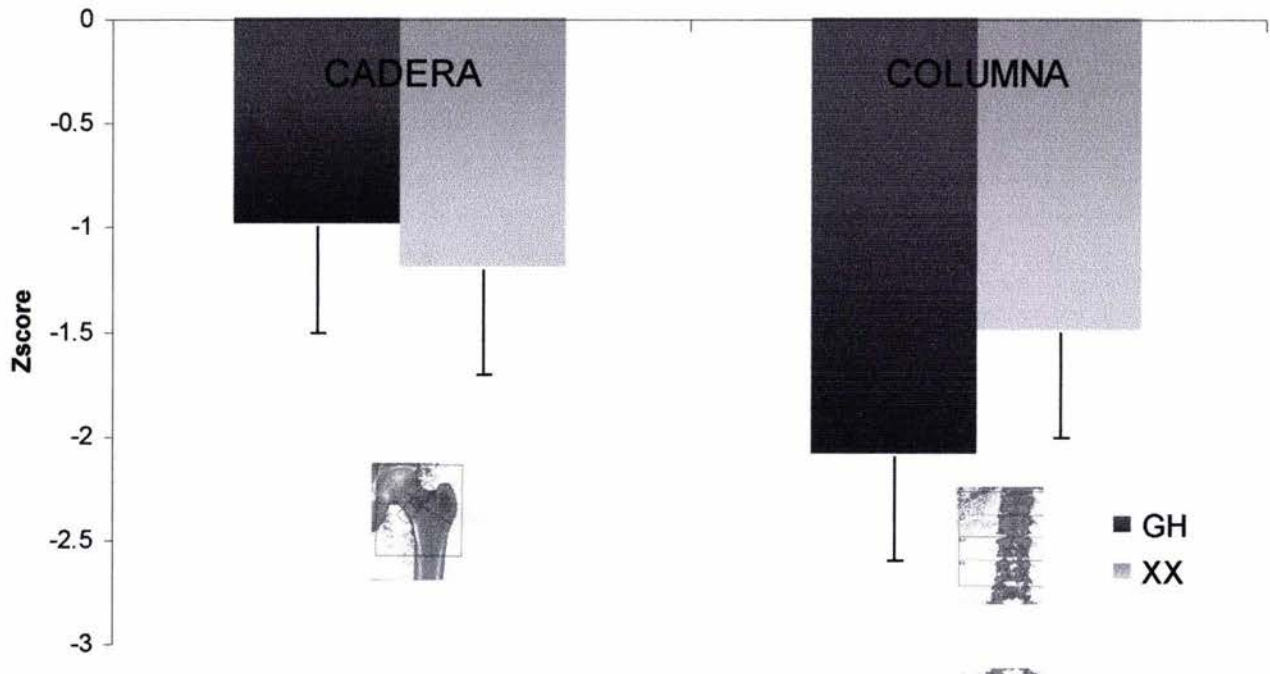


Figura 20. Se muestran los valores de Z score de DMO tanto en columna, como en cadera, entre el grupo de individuos que poseen genotipo GH, y los que presentan otro tipo de genotipo excluyendo los alelos GH.

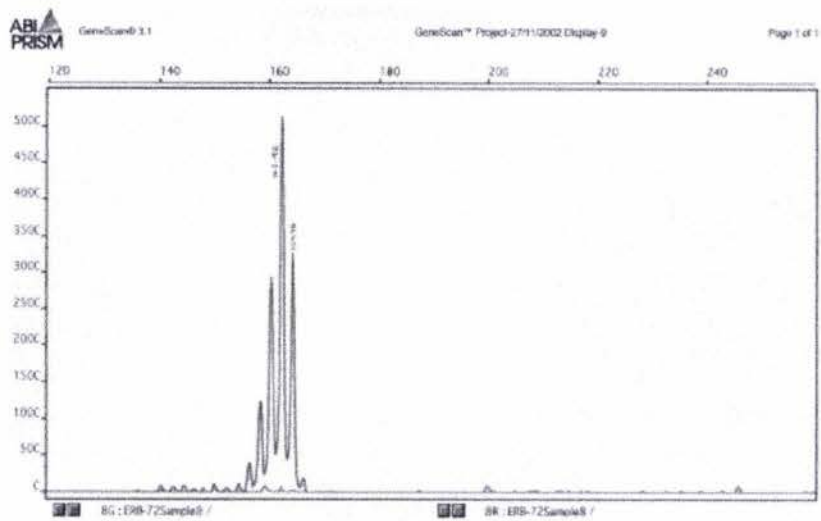


Figura 21. Patrón obtenido para el genotipo GH, a través de EC.

## VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Muchas de las enfermedades de actualidad, las cuales constituyen los principales problemas de salud pública a nivel mundial, se manifiestan de forma silenciosa y en muchos casos las consecuencias producen discapacidades por el resto de la vida, limitando al individuo que la padece a disminuir de forma considerable su calidad de vida. La OP es sólo una más de ellas, en las que nuestro país invierte cantidades exorbitantes en sus tratamientos, sin embargo, ninguno de ellos garantiza la recuperación total por parte del enfermo. Es por ello que actualmente se ha considerado la necesidad de implementar técnicas que nos permitan conocer de forma temprana el desarrollo de enfermedades y a través de este diagnóstico poder tratar de forma preventiva a los pacientes. El diagnóstico molecular ha venido a revolucionar muchas enfermedades, en las cuales ha sido posible conocer de forma temprana y precisa la probabilidad de un individuo a padecer determinada enfermedad. Para ello es necesario emplear técnicas de biología molecular, así como hacer uso de las propias herramientas del genoma para descifrar cual será nuestro futuro con respecto a determinada enfermedad, y con ello trabajar anticipadamente para prevenir, en la medida en que sea posible, su desarrollo.

Este estudio es el primero que investiga la asociación del polimorfismo del gen  $ESR\beta$  en una muestra de mujeres que presentan problemas de pérdida de DMO, desarrollando osteopenia y consecuentemente OP en nuestro país.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo han permitido conocer que el polimorfismo del gen del receptor de estrógeno beta se encuentra distribuido homogéneamente ( $HZ=0.92$ ) en nuestra muestra analizada por lo que se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, y posee una elevada diversidad genética ( $I=2.2176$ ) por lo que podemos considerarlo como un marcador que tiene grandes posibilidades de ser informativo. Así mismo, los cálculos poblacionales nos indican que el  $pD$  es de 0.96, lo cual además de volver a justificar la elevada variabilidad del mismo, nos permitió conocer que es justo su polimorfismo aunado a la variabilidad genética lo que le

otorga a este marcador la posibilidad de discriminar a casi 96 individuos de 100. Finalmente, la PCA indica que de acuerdo con la distribución de los alelos del marcador, cada uno de ellos puede presentarse de forma azarosa en nuestra población una vez cada 100 casos ( $PCA=0.01$ ).

Por otro lado, se muestra una mínima presencia de homocigotos ( $H_o$ ), lo que elimina la posibilidad de que las frecuencias de distribución alélica sean altas para determinados genes, así la probabilidad de que un individuo posea determinado genotipo disminuye conforme se reduce la frecuencia de distribución para un alelo. Finalmente, el árbol de distancias génicas de Nei, muestra que el análisis de los datos permite situarlos en 2 subpoblaciones, la primera que involucra a la población general, a la población sana y a la población con osteopenia, las cuales presentan pocas diferencias entre ellas, y consideramos que éstas están determinadas por el tamaño de la muestra, y la segunda subpoblación que involucra a la población con OP. Esto indica de forma muy general que al parecer el comportamiento de la población con OP, a pesar de ser similar al de las otras poblaciones, presenta una carga genética característica que la hace dividirse del resto de las poblaciones estudiadas.<sup>91</sup>

Con respecto a las gráficas de dispersión de tamaño alélico, a través de las cuales se sabe que los pesos moleculares de los alelos presentes en cada individuo en este estudio mostraron un comportamiento estable y confiable, se mantuvieron dentro de un rango de  $\pm 0.5$  bases, del valor asignado. Esto resulta de gran importancia debido a que en los microsatélites dinucleótido, el alelo siguiente se encuentra a 2 bases de diferencia (fig. 11), por lo que resultaría poco confiable una elevada dispersión y lo que nos permite considerar que los métodos empleados presentan alta precisión y pueden ser usados como un buen método de diagnóstico.

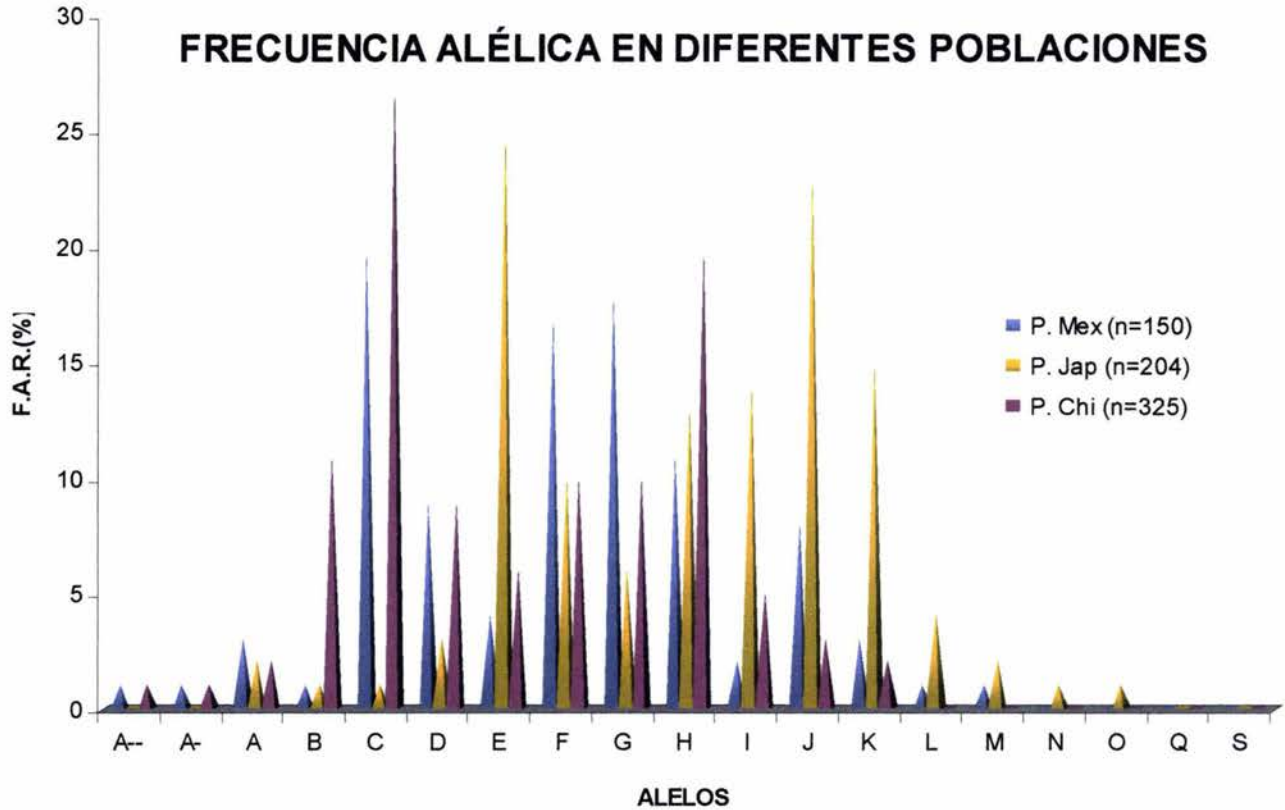
Con respecto a las frecuencias de distribución alélica, las cuatro poblaciones estudiadas presentan un comportamiento análogo, sin presentar diferencias significativas en la distribución, lo cual también fue corroborado por la ley de Hardy-Weinberg ya que todas nuestras poblaciones se encuentran en equilibrio, sin embargo, las poblaciones con osteopenia con OP presentaron alelos con mayor número de repetidas ( $\geq 30$ ), los cuales no

se encontraron presentes en la población general, ni en la población normal, incluso teniendo el doble de individuos en estudio, por lo que se puede considerar que estos alelos podrían ser indicativos de algún padecimiento ligado a desordenes óseos, sin embargo esto resulta muy aventurado, ya que para ello se requeriría un estudio con un mayor número de pacientes que nos permitiera comprobar esta suposición. Así mismo, la falta de diferencias significativas intrapoblacional con respecto a la distribución alélica, nos corrobora que el diagnóstico a través de un alelo relacionado con el padecimiento de OP es incierto, y poco confiable, ya que la población general, muestra un comportamiento casi idéntico a una población con problemas de OP, y un diagnóstico a través de un alelo, con respecto a este gen es de poco valor diagnóstico.<sup>77 89 97</sup>

El estudio de distribución alélica nos permitió detectar la presencia de dos nuevos alelos, los cuales no han sido reportados a la fecha en otras poblaciones, estos alelos podrían ser característicos de la población mestiza-mexicana, lo que nos comprueba la importancia de los estudios genéticos para cada población, así como la imposibilidad de tomar las características de otras poblaciones para evaluar un padecimiento genético en una población diferente. Para llevar a cabo la caracterización de los supuestos alelos nuevos encontrados (denominados Q y S), sería necesario efectuar la secuenciación de la región polimórfica de estas muestras, lo cual nos permitiría conocer el tamaño de la repetición y así determinar de forma certera si nuestra población presenta estos alelos.

Al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en nuestras poblaciones con las reportadas para otras poblaciones, se pudo observar una cierta similitud en cuanto al comportamiento de algunos alelos con respecto a la población China, sin embargo el comportamiento en general resulta totalmente diferente con respecto a estas poblaciones (Japonesa y China), en las cuales los rangos alélicos van de 150- 178bp (Japón) predominando el alelo E (25%), y de 146-170bp para la población China, en la cual el alelo C (27%) resulta ser el más frecuente. Los resultados en la población mexicana presentan un rango de 146 a 174bp, predominando la presencia de los alelos C y G (20 y 18% respectivamente), cabe mencionar que este rango se incrementa de 146 a 186bp para la población OP, predominando la presencia de los alelos G y F (23 y 19% respectivamente).

Todas estas diferencias genéticas señalan que el origen genético es totalmente disímil entre las diferentes poblaciones.<sup>101, 102</sup>



*Figura 22. Comparación de la genética de población registrada para el gen ESR $\beta$  en diferentes países. . Tomados de Ogawa et. al 2000 y Lau et. al 2002.*<sup>101,102</sup>

Con respecto a la frecuencia Genotípica, se observó que la frecuencia del genotipo GH es muy elevada en la población OP, en la cual se presenta en más del 20% de los casos estudiados, mientras que en la población general se presenta en menos del 5%, lo cual nos indica una diferencia significativa muy importante ( $P=0.004$ ), aun cuando en la población general ( $n=300$  alelos) la cual hubiera tenido mayor posibilidad de presentar este genotipo por el mayor número de cromosomas analizados. Con respecto al mismo genotipo, pero para la población con osteopenia no se encuentra una diferencia significativa ( $P=0.307$ ) al compararla con la población general, lo cual esta intrínsecamente relacionado con la baja frecuencia de este genotipo en pacientes con esta fase previa de la enfermedad, sin embargo los pacientes que presentaron el genotipo GH, pero con osteopenia están asociados con una

elevada probabilidad de fractura ósea lo que fue reportado por el estudio de DMO y de acuerdo con los datos aportados por la OMS.

Otro genotipo que muestra diferencias significativas ( $P=0.001$ ) entre la población normal contra la población OP, es EF, el cual tiene un porcentaje del 7% en la población OP y no aparece en la población normal, por lo que al igual que GH podríamos sugerir cierta relación con la presencia de OP. Para el caso de este mismo genotipo, pero en los casos estudiados con osteopenia no se encontró diferencia significativa ( $P=0.055$ ), lo cual se explica de una forma muy similar a lo que sucede con GH en la misma población.

Finalmente, los genotipos **JF** y **SS** se presentan en mayor o exclusiva proporción (%) en la población con OP, por lo que también podríamos considerarlos implicados, sin embargo, la estadística no muestra diferencias importantes al compararlos con los datos de la población en general para el genotipo JF ( $P=0.063$ ), y muestran una diferencia significativa ( $P=0.022$ ) para el genotipo SS, sin embargo consideramos necesario ampliar el tamaño de la muestra para poder incrementar la posibilidad de encontrar otros casos, ya que aunque la diferencia sea importante es muy prematuro darle relación con la disminución de DMO cuando sólo se tiene un caso y este podría ser producto del azar.

Con el fin de relacionar los genotipos con la pérdida de DMO se realizaron los estudios para conocer cuál era la pérdida de DMO en cadera y columna, así como cuál era el valor de Z-score (el cual relaciona las desviaciones estándar con respecto a los valores promedio de una persona sana) para los genotipos que presentaron diferencias significativas en su frecuencia con respecto a las frecuencias de la población normal. Así se buscó la posible asociación de los genotipos **GH** y **EF** con la pérdida de DMO en cadera y columna.<sup>101</sup>

Para el caso de **GH**, no se encontró ninguna relación importante con la disminución de DMO en cadera, la cual presenta valores de pérdida muy similares a los presentados por otros genotipos, sin embargo para el caso de columna se encontró una disminución de cerca del 40%, lo cual es muy similar a lo que presenta EF y el resto de los genotipos (XX), lo que



nos llevó a analizar el valor de Z-score, el cual nos indica que el genotipo GH se encuentra por debajo de las 2 desviaciones estándar de una persona sana, estableciendo con ello la importancia de esta pérdida ósea. Al comparar GH con el resto de los genotipos encontramos que el 2.1 de pérdida representa a sólo 6 individuos de 29, y que la pérdida del 1.5 del Z-score de XX representa a 22 individuos de 29 cuyos valores de Z-score no serían importantes por separado, lo que nos indica la importancia de GH como genotipo con elevadas posibilidades de asociación a la disminución de la DMO, ya que presenta una diferencia significativa muy importante ( $P=0.00009$ ).

Para el caso de EF, no se encontró ninguna diferencia importante para cadera ni para columna, por lo que se puede considerar que las importantes diferencias entre las frecuencias de la población general y la población con OP son aleatorias y que al aumentar el tamaño de la muestra de pacientes con OP estas se verán diluidas.

Finalmente, se puede especular que cuando la OP se ha desarrollado, los valores de pérdida de DMO se incrementan en mayor proporción en los individuos que presentan el genotipo GH, sin embargo, en los casos de osteopenia, GH no influyen en la velocidad de la pérdida de DMO, ya que aquí otros factores intrapersonales, como la edad, alimentación, actividad física etc, podrían afectar el desarrollo de la osteopenia.

Así, podemos considerar que la velocidad de la pérdida de DMO puede estar determinada además del genotipo por otros factores generalmente ambientales, sin embargo los posibles mecanismos que puedan relacionar a la pérdida de DMO con el polimorfismo de ESR $\beta$ , no es clara aún, pero podemos considerar algunas teorías como una posible explicación: a) Este polimorfismo podría afectar directamente o indirectamente el nivel de expresión (elementos regulatorios) en la regulación transcripcional; b) El polimorfismo dinucleótido CA podría estar relacionado con otro polimorfismo en el mismo o en otro exón, el cual podría tener una implicación sobre la función proteica del ESR $\beta$ ; o c) el polimorfismo puede estar relacionado con la mutación de otro gen adyacente no identificado que afecta directa indirectamente a la DMO.<sup>20</sup>

## VII. CONCLUSIONES

- De acuerdo con el análisis genético poblacional que se llevó a cabo de este receptor podemos considerar que el polimorfismo del gen del receptor de estrógeno beta cumple con todos los requisitos mínimos indispensables para ser considerado un marcador altamente informativo con posibles fines diagnósticos.
- El genotipo **GH** parece estar relacionado directa o indirectamente con la pérdida y /o disminución de la densidad mineral ósea de columna, lo cual nos permitiría conocer la predisposición individualizada a padecer la enfermedad, y lo que lo convierte en una herramienta diagnóstica poderosa que nos permitiría detectar la población de riesgo de esta enfermedad, evitando en la medida de lo posible su desarrollo y disminuyendo con ello los costos para el sector salud así como la incapacidad en los pacientes que la padezcan.
- Sabemos que existen importantes diferencias entre la predisposición genética a OP y las características raciales. Nuestra población, es una mezcla racial entre caucásicos (Europeos) los cuales presentan elevadas prevalencias e indígenas de los cuales desconocemos completamente su predisposición, por lo que sería importante conocer el componente genético de nuestra población mestiza a desarrollar la OP. Es posible que el genotipo GH nos permita conocer de forma anticipada la susceptibilidad a esta enfermedad y con ello establecer programas preventivos a nivel nacional, que nos evitarían en el mejor de los casos su desarrollo.
- Sabemos que un solo marcador no es un factor determinante para conocer la predisposición a una enfermedad, ya que el factor ambiental juega un papel muy importante, sin embargo el genotipo **GH** aunado a otros genotipos de otros marcadores posiblemente asociados a OP permitirán conocer el componente genético de esta enfermedad con fines de diagnóstico molecular certero así como de tratamientos farmacológicos individualizados que constituyan las bases de la farmacogenómica.

- Los polimorfismos del receptor de estrógeno beta no sólo pueden ser útiles como herramientas diagnósticas y farmacológicas de la OP, ya que en el mismo cromosoma se encuentran otros padecimientos cuyos loci se encuentran íntimamente ligados con otros desórdenes óseos tales como el condrosarcoma humano y el osteosarcoma.<sup>101</sup>

## VIII. PERSPECTIVAS

- a) Es necesaria la reproducción y análisis por secuenciación de los alelos Q y S encontrados, para verificar su presencia. De ser así, la población mestiza mexicana presentaría alelos no reportados en otras poblaciones estudiadas, lo que elevaría la variabilidad genética.
- b) Se requiere aumentar el número de sujetos de estudio con el fin de fortalecer la validez externa del presente estudio piloto.
- c) Se sugiere que el estudio se realice a nivel nacional, abarcando diferentes regiones del país, así como grupos étnicos.
- d) Realizar estudios clínicos y diagnósticos en poblaciones jóvenes ya que datos internacionales sugieren que la OP no es específica de mujeres pre y postmenopáusicas y se conocen casos reportados de mujeres de 20 años con un padecimiento franco.
- e) Realizar estudios en poblaciones con las mismas características, pero de origen masculino ya que la OP no es exclusiva de sexo femenino.

1. Barreira E, Delezé M, Morales J. (2000). Pérdida de masa ósea durante el climaterio (Estudio de 490 casos en el cuello del fémur). *Rev Endocrinología y Nutrición*, 8(4):43-47.
2. Slemenda CW, Hui SL, Longcope C, Wellman H, Johnston CC. (1990). Predictors of bone mass in perimenopausal women. A prospective study of clinical data using photon absorptiometry. *Am Intern Med* Jan 15 112:2 96-101.
3. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, and Orimo H. (1995). Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem and Biophys Res Comm*, 217: 378-383.
4. Becherini L, Gennari L, Mansani R, Massart FM, Falchetti A, Gonnelli S, Fiorelli G, Tanini A. (2000). Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphism in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet*, 9(13): 2043-50.
5. Uitterlinden A, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan F, Grant S, Hofman A, van Leeuwen J, Pols H, Ralston S. (1998). Relation of alleles of the collagen type Ia1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 338:1061-21.
6. Cooper C, Atkinson EJ, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL, Judd HL, Melton LJ. (1992). Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res*, Apr 7:4 465-71
7. Wilson DJ, Braunwald E, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12.ª ed. New York: Mc Graw-Hill, Vol II, 1991. pp2225-2227.
8. Rodés J., Guardia M.J. *Medicina Interna*. 12.ª ed. Barcelona: edit Masson, S.A., tomo II, 1997. pp2800-2806.
9. Riggs. B. L., and Melton, L. J. D. (1986). Risks Factors of Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 314, 1676-1686.
10. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW, Anderson JJ.. (1993). The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N. Engl. J. Med*, 1141-1146.
11. Moore K. (1996) *Anatomía con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 4ª Edición.
12. Wilson DJ, Braunwald E, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12.ª ed. New York: Mc Graw-Hill, Vol II, 1991. pp2225-2227.
13. Favus MJ, *Primer on the Metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 3.ª ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 1996.
14. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC, Skeletal effects of estrogen. (1994). *Endocr. Rev.* 15 275-300.
15. Prince RL, (1994). Estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis, *Endocr. Rev.* 15: 301-309.
16. Moselman S, Polman J, Dijkema R, (1996). ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *FEBS Lett.* 392: 49-53.
17. Bland R, (2000). Steroid hormone receptor and action on bone, *Clin. Sci.* 98: 217-240.
18. Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Gustafsson DJ, Ohlsson C, (2000). Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 5474-5479.
19. Cutler GB, (1997). The role of estrogen in bone growth and maturation during Childhood and adolescence, *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 61:141-144.
20. Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML. (2002) Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81: 1-24.
21. Gilberg P, Johansson AG, Ljungall S. (1999). Decreased estradiol levels and free androgen index an elevated sex hormona- binding globulin levels in male idiopathic osteoporosis, *Calcif. Tissue Int.* 64: 209-213.
22. Morishima A, Grumbach, M M, Simpson E R, Fisher C, Qin K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and physiological role of estrogens. *J Clin Enol Metab* 80: 3689-3698.
23. Fiorelli G, Gori F, Petilli M, Tanini A, Benvenuti S, Serio M, Bernabei P, Brandi, ML. (1995) Functional estrogen receptors in a human pre-osteoclastic cell line, *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 92: 2672-2676.
24. R. Pacifi. (1998). Cytokines, estrogen and post-menopausal osteoporosis: The second decade, *endocrinology* 139: 2659-2661.

25. Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. (1990). Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> in oophorectomized women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 1288-1293.
26. Smith EP, Boyd J, Frank G R, Takahashi H, Cohen R M, Specker B, Williams TC, Lubhan D B, Korach K S. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in estrogen receptor gene in man. *N Engl J Med* 331: 1056-1061.
27. Couse JF, Korach KS. (1999) . Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocr. Rev.* 20, 358-417.
28. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. (2002). Sex Steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57: 385-409.
29. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Maramatsu M, Inoue S. (2000). Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J. Biol. Chem.* Jul 275:21 372- 379.
30. Brady H, Doubleday M, Gayo-Fung LM, Hickman M, Khammungkhune S, Kois A, Lipps S, Pierce S, Richard N, Shelvin G, Sutherland MK, Anderson DW, Bhagwat SS, Stein B. (2002). Differential response of estrogen receptors alpha and beta to SP500263, a novel potent selective estrogen receptor modulator. *Mol Pharmacol* Mar 61: 562-568.
31. Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. (2001) Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expresión, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice *J. Cell Biochem Suppl* 36; 144-155.
32. Gustafsson J.A.(1999). Estrogen receptor beta- a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinology* 163; 379-383. isman John. (2001). Pharmacogenetics of the vitamin D receptor and osteoporosis. *The American Society for Pharmacology and experimental Therapeutics DMD* 29: 505-512.
33. Krall EA, Dawson-Hughes B.(1993). Hereditary and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner*, 8:1-9.
34. Obermayer-Pietsch B, Chararas C, Kotschan S, Leeb G. (2000). Genetic background of osteoporosis. *Acta Med Austriaca*, 27(1): 18-22.
35. Luckey MM, Meier DL, Mandeli IP, Da Costa MC, Hubbard ML, Goldsmith SI. (1989). Radial and vertebral bone density in white and black women: Evidence for racial differences in pre-menopausal bone homeostasis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69: 762-770.
36. Schnitzler CM, Pettifor JM, Mesquita JM, Bird DT, Schnaid E, Smyth AE. (1990). Histomorphometry of iliac crest bone in 346 normal black and white South African Adults, *Bone Miner.* 10 :83-199.
37. Cundy T, Cornisa J, Evans MC, Gamble G, Stapleton J, Reid IR. (1995). Sources of Inter-racial variation in bone mineral density, *J. Bone Miner. Res* 10: 368-373.
38. Seeman E, Hopper JL, Bach LA, Cooper ME, Parkinson E, McKay J, Jerums C. (1989). Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis, *NeW Engl. J. Med.* 320: 554-558.
39. Stewart TL, and Ralston SH.(2000) Role of genetics in the pathogenesis of osteoporosis. *J of Endocrinology.* 166: 235-245.
40. Diaz MN, O'Neill TW, Silman AJ (1997). The influence of family history of hip fracture on the risk of vertebral deformity in men and women. The European Vertebral Osteoporosis study, *Bone* 20: 145-149.
41. Gong G, Haynatzki G, Mordeson J, Cheng S-C, Fong N, Recker RR. (2002). Association between bone mineral density and candidate genes in different races and its implications. *Chin Med J* 2002,115(3):116-121.
42. Nguyen TV, Blangero J, Eximan JA. (2000). Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner*, 15(3):392-401.
43. Devoto M, Shimoya K, Caminis J, Ott J, Tenenhouse A, Whyte MP, Sereda L, May S, Considine E, Williams CJ, Tromp G, Kuivaniemi H, Ala-Kokko L, Prockop DJ, Spotila LD. (1998). First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggest genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p, and 4 q. *Eur J Hum Genet* 6: 151-157.
44. Mitchell BD, Bauer RL, Perez R, Slifer SH, Cole SA, Hixson JE, McCluer JW. (1998). Genome-wide scan for loci influencing bone density in Mexican Americans. *Am J Human Genet* 63: A301.
45. Duncan EL, Brown MA, Sinsheimer JS, Carr AJ, Wordsworth BP, Wass JA. (1998). Candidate gene linkage screen in Osteoporosis. *Bone* 23: S160 (Abs 1049).

46. Cauley JA, Zmuda JM, Yaffe K, Kuller LH, Ferrell RE, Wisniewski SR, Cummings SR. (1999). Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk--The Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner* Jul 14:7 1175-81.
47. Stulc T, Ceska R, Horinek A, Stepan J. (2000). Bone mineral density in patients with apolipoprotein E type 2/2 and 4/4 genotype. *Physiol Res*, 49:4 435-9.
48. Pocock AE, Francis MJ, Smith R. (1995). Type I collagen biosynthesis by skin fibroblasts from patients with idiopathic juvenile osteoporosis. *Clin Sci (Lond)* Jul 89:1 69-73.
49. Thoshino H, Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, Inoue. (1999). The relationships between the degree of beta-isomerization of type I collagen degradation products in the urine and aging, menopause and osteoporosis with fractures. *Osteoporos Int*, 9:5 405-9.
50. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Boonen S. (2000). Polymorphisms of the VDR, ER and COL1A1 genes and osteoporotic hip fracture in elderly postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 11:7 583-91.
51. Bonaventure J, Stanescu R, Stanescu V, Allain JC, Muriel MP, Ginisty D, Maroteaux P. (1992). Type II collagen defect in two sibs with the Goldblatt syndrome, a chondrodysplasia with dentinogenesis imperfecta, and joint laxity. *Am J Med Genet*, Dec 1 44:6 738-53.
52. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. (1997). Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 4 300-15.
53. Grainger DJ, Percival J, Chiano M, Spector TD. (1999). The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporos Int*, 9:5 398-404.
54. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. (1998). Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell*, Jul 9:7 1903-18.
55. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K. (1998). Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner* Oct 13:10 1569-76.
56. Erlebacher A, Derynck R. (1996). Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* Jan 132:1-2 195-210.
57. Dunstan CR, Boyce R, Boyce BF, Garrett IR, Izbicka E, Burgess WH, Mundy GR. (1999). Systemic administration of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) prevents bone loss and increases new bone formation in ovariectomized rats. *J Bone Miner*, Jun 14 6 953-9.
58. Servold SA. Growth. (1991) Factor impact on wound healing. *Clin Podiatr Med Surg*, Oct 8:4 937-5.
59. Jakob F, Siggelkow H, Homann D, Kohrle J, Adamski J, Schutze N. (1997). Local estradiol metabolism in osteoblast- and osteoclast-like cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, Apr 61:3-6 167-74.
60. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, Franchimont N, Geenen V, Albert A, Reginster JY. (1997). Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*, Jan 26 1 63-71.
61. Dickson IR, Gwilliam R, Arora M, Murphy S, Khaw KT, Phillips C, Lincoln P. (1994). Lumbar vertebral and femoral neck bone mineral density are higher in postmenopausal women with the alpha 2HS-glycoprotein 2 phenotype. *Bone Miner*, Mar 24 3 181-8.
62. Duggan ME, Duong LT, Fisher JE, Hamill TG, Hoffman WF, Huff JR, Ihle NC, Leu CT, Nagy RM, Perkins JJ, Rodan SB, Wesolowski G, Whitman DB, Zartman AE, Rodan GA, Hartman GD. (2000). Nonpeptide alpha(v)beta(3) antagonists. 1. Transformation of a potent, integrin-selective alpha(IIb)beta(3) antagonist into a potent alpha(v)beta(3) antagonist. *J Med Chem*, Oct 5 43:20 3736-45.
63. Cosman F, Nieves J, Woelfert L, Shen V, Lindsay R. (1998). Alendronate does not block the anabolic effect of PTH in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner*, Jun 13:6 1051-5.
64. Rubin MR, Bilezikian JP (2002). The potential of parathyroid hormone as a therapy for osteoporosis. *Int J Fertil Womens Med*, May-Jun 47:3 103-15.
65. Pietschmann P, Grisar J, Thien R, Willheim M, Kerschman\_Schindl K, Preisinger E, Peterlik M. (2001). Immune phenotype and intracellular cytokine production of peripheral blood mononuclear cells from postmenopausal patients with osteoporotic fractures. *Exp Gerontol*, Nov 36:10 1749-59.
66. Jorgensen NR. (1997). [Cytokines and osteoporosis] *Ugeskr Laeger*. Dec 29 160:1 24-8.

67. Shinohara Y, Ezura Y, Iwasaki H, Nakazawa I, Ishida R, Kodaira M, Kajita M, Shiba T, Emi M. (2001). Linkage disequilibrium and haplotype analysis among ten single-nucleotide polymorphisms of interleukin 11 identified by sequencing of the gene. *J Hum Genet*, 46:8 494-7.
68. Pratelli L, Cenni E, Granchi D, Tarabusi C, Ciapetti G, Pizzoferrato A. (1999). Cytokines of bone turnover in postmenopause and old age. *Minerva Med*, Apr 90:4 101-9.
69. Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC. (1999). Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics*, Sep 1 60:2 210-7.
70. Noda M, Vogel RL, Craig AM, Pahl J, DeLuca HF, Denhardt DT. (1990). Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Dec 87:24 9995-9.
71. Tsukamoto K, Watanabe I, Shiba T, Emi M. (1998). Isolation and radiation hybrid mapping of a dinucleotide repeat polymorphism at the human calcium-sensing receptor (CASR) locus. *J Hum Genet*, 43:4 280-2.
72. Audran M, Legrand E. (2000). Hypercalciuria. *Joint Bone Spine* 67:6 509-15.
73. Pondel M. (2000) Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*, Dec 81:6 405-22.
74. Gennari C, Agnusdei D. (1994). Calcitonins and osteoporosis. *Br J Clin Pract*, Jul-Aug 48:4 196-200.
75. Deng HW, Li J, Li JL, Dowd R, Davies KM, Johnson M, Gong G, Deng H, Recker RR. (2000). Association of estrogen receptor-alpha genotypes with body mass index in normal healthy postmenopausal Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab*, Aug 85:8 2748-51.
76. King R, Rotter J, Motulsky A. (1992). *The Genetic Basis of Common Diseases*. Oxford University Press. New York. U.S. 1ª Edición.
77. Klug W, Cummings M. (2001). *Conceptos de Genética*. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 2ª Edición.
78. Caetano G, Gresshoff P. (1997). *DNA Markers, Protocols, Applications, and Overviews*. Ed. Wiley-VCH. New York, U.S. 1ª Edición.
79. Lewin B. (2001) *Genes VII*. Ed. Marbán. Madrid, España. 1ª Edición.
80. Budowle B, Smith J, Moretti T, DiZinno J. (2000). *DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. Eaton Publishing. U.S. 1ª Edición.
81. Schifreen R, Storts DR, and Buller AM. (2002). The challenge of using SNP in the understanding and treatment of disease. *BioTechniques* 32:S14-S21.
82. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart T, Grant S, Robins SP, Aspden RM, and Ralston SH. (2001). A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *The J of Clin Invest*, 107 (7): 899-907.
83. Tao C, Yu T, Garnett S, Brody J, Knight J, Woodhead H, Cowell CT. (1998) Vitamin D receptor alleles predict growth and bone density in girls. *Arch Dis Child*, 79:448-494.
84. Salamone LM, Cauley JA, Zmuda J, Pasagian-Macaulay A, Ferrell RE, Black DM, Kuller LH (2000). Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J Bone Miner*, 15(2) 308-14.
85. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL, Weatherall DJ, Ponder BA. (1986) DNA "fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am J Hum Genet*. 39:11-24.
86. Pastore L, Vuttariello E, Sarrantonio C, Coto L, Rivello S, Fortunato G, Salvatore F, Saechetti L. (1996). Allele frequency distribution at several variable number of tandem repeat (VNTR) and short tandem repeat (STR) loci in a restricted Caucasian population from South Italy and their evaluation for paternity and forensic use. *Mol Cell Probes*. 10, 299-308.
87. Smith RN. (1995). Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *BioTechniques* 18:122-128.
88. Hudson TJ, Stein LD, Gerety SS, Ma J, Castle AB, Silva J, Slonim DK, Baptista R, Kruglyak L, Xu SH, et al. (1995). An STR-based map of human genome. *Science* 270:1945-195.
89. Sprecher C, Puers C, Lins AM, Schumm JW. (1996). General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques* 20:266-276.
90. Hartl D. (1980) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc Publishers Massachusetts, U.S. 1ª Edición.



91. Griffiths A, Gelbart W, Miller J, Lewontin R. (2000). *Genética Moderna* Ed. Mc Graw-Hill – Interamericana de España. Madrid, España. 1ª Edición.
92. Zmuda JM, Cauley JA, and Ferrell RE. (2001). Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiology Rev*, 22(2):203-217.
93. Windhal SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C. (1999). Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone density in female ER $\beta$  (-/-) mice, *J. Clin. Invest.* 104: 895-901.
94. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shinc J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA, *Science* 231: 1150-1154.
95. Schubert EL, Lee MK, Newman B, King MC. (1999). Single nucleotide polymorphisms (SNP's) in the estrogen receptor gene and breast cancer susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 71: 2127.
96. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. (1996). Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.* 11: 306-311.
97. Ho AY, Yeung SS, Kung AW. (2000). Pvu 11 polymorphism of the estrogen receptor  $\alpha$  and bone mineral density in healthy southern Chinese women. *Calcif. Tissue Int*, 66:405-408.
98. Larigadhi BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjer LL, Eriksen EF. (2000). A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J. Bone Miner. Res.* 15: 2222-2230.
99. Sowers M, Willing M, Bums T, Deschenes T, Hollis B, Crutchfield M, Jannusch M. (1999). Genetic markers, bone mineral density and serum osteocalcin levels, *J. Bone Miner. Res.* 14: 1411-1419.
100. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Emi M, Maramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. (2000). Association of estrogen receptor  $\beta$  gene polymorphism with bone mineral density, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 269 537- 541.
101. Lau HH, Ho AY, Luk KD, Kung AW, (2002) Estrogen receptor beta gene polymorphisms are associated with higher bone mineral density in Premenopausal, but not postmenopausal Southern Chinese women. *Bone* Vol 31, No.2. 2002; 276-281.
102. Sambrook, J., Fritsch, E F., and Maniatis, T. *Molecular cloning A laboratory manual*. Third ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Press, 1994.

---

## ANEXO I.

### Genotipos encontrados en la población general con el locus ESR $\beta$

No.MUESTRA	bp	Alelo	bp	Alelo
PGN483	160.69	F	162.55	G
PGN485	160.53	F	160.53	F
PGN487	156.63	D	168.61	J
PGN488	156.59	D	162.49	G
PGN489	154.77	C	158.6	E
PGN491	156.89	D	162.49	G
PGN497	156.66	D	168.65	J
PGN498	156.62	D	162.58	G
PGN499	164.69	H	164.69	H
PGN500	155.04	C	168.8	J
PGN503	158.64	E	162.6	G
PGN504	150.52	A	164.47	H
PGN505	160.68	F	162.44	G
PGN506	150.57	A	164.68	H
PGN507	154.44	C	158.37	E
PGN509	148.73	A-	156.62	D
PGN510	164.6	H	168.46	J
PGN511	154.59	C	156.4	D
PGN514	150.43	A	158.55	E
PGN515	160.61	F	162.45	G
PGN517	160.64	F	162.46	G
PGN518	162.51	G	166.53	I
PGN524	156.5	D	168.47	E
PGN527	154.7	C	162.8	G
PGN530	168.41	J	168.41	J
PGN533	160.57	F	162.58	G
PGN534	160.42	F	162.48	G
PGN535	160.63	F	162.82	G
PGN539	154.84	C	156.83	D
PGN542	154.8	C	160.49	F
PGN548	154.8	C	160.53	F
PGN549	160.61	F	162.62	G
PGN558	154.62	C	164.56	H
PGN567	154.56	C	164.27	H
PGN568	156.47	D	160.66	F
PGN571	162.37	G	166.61	I
PGN573	171.82	L	171.82	L
PGN575	158.46	E	164.43	H
PGN576	148.52	A-	160.49	F
PGN589	158.58	E	168.59	J
PGN593	162.56	G	164.56	H
PGN601	156.67	D	162.58	G
PGN603	148.72	A-	160.62	F
PGN605	156.58	D	162.77	G
PGN614	150.56	A	164.42	H

<b>No.MUESTRA</b>	<b>bp</b>	<b>Alelo</b>	<b>bp</b>	<b>Alelo</b>
PGN622	164.05	H	166.05	I
PGN664	154.58	C	156.3	D
PGN667	162.5	G	162.5	G
PGN669	164.13	H	168.15	J
PGN672	154.81	C	160.59	F
PGN680	154.8	C	168.61	J
PGN681	153.89	C	167.76	J
PGN686	154.84	C	162.61	G
PGN691	154.75	C	160.48	F
PGN772	160.15	F	168.03	J
PGN773	152.74	B	154.66	C
PGN774	154.72	C	164.42	H
PGN775	160.5	F	170.51	K
PGN777	162.62	G	168.62	J
PGN778	160.6	F	160.6	F
PGN780	158.67	E	164.56	H
PGN785	160.7	F	162.6	G
PGN787	154.92	C	156.76	D
PGN788	160.74	F	162.72	G
PGN789	156.59	D	160.51	F
PGN790	154.5	C	156.3	D
PGN791	160.4	F	166	I
PGN792	160.17	F	170.05	K
PGN794	158.24	E	158.24	E
PGN795	154.7	C	160.8	F
PGN796	154.6	C	164.09	H
PGN798	160.49	F	162.47	G
PGN801	154.94	C	166.75	I
PGN898	154.62	C	162.08	G
PGN899	154.51	C	154.51	C
PGN901	154.47	C	162.05	G
PGN904	154.5	C	158.09	F
PGN905	154.5	C	162.64	G
PGN906	160.69	F	162.72	G
PGN907	154.7	C	167.25	I
PGN908	154.9	C	162.59	G
PGN909	162.53	G	164.43	H
PGN910	160.58	F	164.82	H
PGN911	154.9	C	162.58	G
PGN913	164.49	H	164.49	H
PGN916	154.77	C	162.44	G
PGN917	154.67	C	156.54	D
PGN918	154.76	C	160.53	F
PGN919	156.92	D	160.51	F
PGN920	154.75	C	162.49	G
PGN921	154.42	C	156.49	D
PGN925	154.45	C	164.28	H
PGN926	154.65	C	164.37	H
PGN930	168.2	J	172.19	K
PGN932	154.8	C	162.5	G

---

<b>No.MUESTRA</b>	<b>Bp</b>	<b>Alelo</b>	<b>bp</b>	<b>Alelo</b>
PGN933	160.54	F	162.51	G
PGN938	154.72	C	162.46	G
PGN939	154.78	C	154.78	C
PGN940	154.84	C	164.53	H
PGN947	154.81	C	168.65	J
PGN948	156.7	D	162.67	G
PGN950	160.69	F	162.64	G
PGN952	154.79	C	154.79	C
PGN955	170.17	K	170.17	K
PGN960	156.57	D	156.57	D
PGN961	154.65	C	160.58	F
PGN963	164.52	H	168.55	J
PGN964	168.28	J	168.28	J
PGN965	168.16	J	172.27	M
PGN966	156.74	D	164.38	H
PGN976	169.99	K	169.99	K
PGN995	164.11	H	166.1	I
PGN998	160.1	F	160.1	F
PGN1200	156.57	D	164.56	J
PGN1232	160.6	F	164.52	H
PGN1239	150.06	A	164.31	H
PGN1240	154.71	C	160.5	F
PGN1241	162.08	G	162.08	G
PGN1242	154.74	C	160.55	F
PGN1243	154.76	C	164.43	H
PGN1244	162.05	G	163.98	H
PGN1245	160.05	F	162.07	G
PGN1246	160.69	F	168.77	J
PGN1247	148.53	A-	168.5	J
PGN1248	160.53	F	162.5	G
PGN1250	160.54	F	160.54	F
PGN1251	158.24	E	168.17	J
PGN1255	156.62	D	170.52	K
PGN1257	154.52	C	160.53	F
PGN1258	154.75	C	160.46	F
PGN1261	154.31	C	162	G
PGN1262	156.02	D	181.85	G
PGN1263	148.23	A-	154.32	C
PGN1268	148.15	A-	161.94	G
PGN1269	150.71	A	156.73	D
PGN1270	150.69	A	162.93	G
PGN1272	162.71	G	164.66	H
PGN1273	154.29	C	154.29	C
PGN1278	159.91	F	164.04	H
PGN1279	154.23	H	168.02	J
PGN1280	160.51	F	160.51	F
PGN1281	162.03	G	164.09	H
PGN1285	150.41	A	160.28	F
PGN1286	158.58	E	168.53	J

---

No.MUESTRA	Bp	Alelo	bp	Alelo
PGN1287	150.15	A	154.2	C
PGN1288	151.94	B	161.96	G
PGN1289	156.11	D	164.08	H
PGN1290	154.09	C	159.74	F
PGN1291	154.26	C	162.03	G
PGN1292	169.65	K	169.65	K
PGN1294	160.4	F	164.49	H
PGN1402	150.52	A	156.63	D

Genotipos encontrados en la población con Osteopenia en el locus ESR $\beta$

No.MUESTRA	Bp	Alelo	bp	Alelo
ESRB13	154.81	C	160.64	F
ESRB23	154.7	C	162.24	G
ESRB49	176.1	N	176.1	N
ESRB51	176.36	N	182.91	Q
ESRB52	162.41	G	164.67	H
ESRB53	162.5	G	162.5	G
ESRB55	160.82	F	162.95	G
ESRB59	147.8	A-	161.67	G
ESRB60	154.89	C	162.55	G
ESRB61	154.69	C	164.56	H
ESRB62	164.11	H	168.05	J
ESRB66	162.51	G	164.59	H
ESRB67	160.7	F	162.69	G
ESRB69	154.68	C	168.7	J
ESRB71	154.32	C	154.32	C
ESRB74	155.1	D	160.92	G
ESRB76	154.65	C	154.65	C
ESRB79	160.54	F	164.62	H
ESRB80	162.3	G	162.3	G
ESRB81	160.8	F	162.85	G
ESRB83	154.92	C	168.87	J
ESRB84	162.22	G	166.18	I
ESRB86	162.67	G	164.49	H
ESRB88	160.35	F	162.45	G
ESRB89	160.3	F	164.16	H
ESRB95	156.33	D	162.18	G
ESRB96	154.57	C	160.26	F
ESRB105	156.39	D	164.12	H
ESRB110	156.82	D	160.76	K
ESRB111	150.21	A	160.09	F
ESRB113	160.79	F	160.79	F
ESRB120	160.62	F	162.61	G
ESRB121	154.75	C	158.62	E
ESRB125	152.9	B	154.99	C

---

<b>No.MUESTRA</b>	<b>Bp</b>	<b>Alelo</b>	<b>bp</b>	<b>Alelo</b>
ESRB130	160.61	F	164.57	H
ESRB131	160.69	F	162.65	G
ESRB134	156.53	D	160.44	F
ESRB137	154.68	C	165.38	G
ESRB140	162.45	G	164.51	H
ESRB142	158.68	E	160.62	F
ESRB143	152.48	B	156.59	D
ESRB147	150.56	A	154.85	C
ESRB149	162.55	G	164.7	H
ESRB151	154.76	C	162.47	G
ESRB158	156.81	D	164.43	H
ESRB162	156.46	D	160.46	F

Genotipos encontrados en la población con OP en el locOP

<b>No.MUESTRA</b>	<b>Bp</b>	<b>Alelo</b>	<b>bp</b>	<b>Alelo</b>
ESRB24	154.66	C	156.52	D
ESRB33	148.78	A-	162.51	G
ESRB34	160.29	F	162.16	G
ESRB35	166.22	I	168.19	J
ESRB36	160.85	F	168.61	J
ESRB37	186.48	S	186.48	S
ESRB46	154.82	C	156.66	D
ESRB72	162.42	G	164.38	H
ESRB78	162.67	G	164.68	H
ESRB82	162.14	G	162.14	G
ESRB85	162.34	G	164.21	H
ESRB86	162.67	G	164.49	H
ESRB87	162.18	G	164.19	H
ESRB90	160.72	F	162.8	G
ESRB91	154.73	C	154.73	C
ESRB92	154.91	C	166.6	I
ESRB93	154.83	C	160.4	F
ESRB94	154.63	C	160.3	F
ESRB98	156.34	D	156.34	D
ESRB101	154.77	C	164.72	H
ESRB112	160.84	F	162.86	G
ESRB114	162.3	G	164.28	H
ESRB115	158.47	E	160.39	F
ESRB128	154.68	C	156.57	D
ESRB139	160.47	F	168.5	J
ESRB144	156.5	D	168.44	J
ESRB145	162.46	G	168.54	J
ESRB148	160.7	F	170.48	K
ESRB100	158.46	E	160.45	F

**ANEXO II. Genotipos para cada población.**

GENOTIPOS	POB. GEN	POB. SANA	POB. OPENIA	POB. OP
	N=300	N=58	N=82	N=58
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
A-, C	1	1	0	0
A-, D	1	0	0	0
A-, F	2	2	0	0
A-, G	1	0	1	1
A-, J	1	0	0	0
C, A	1	0	1	0
C, B	2	2	1	0
C, C	4	0	2	1
D, A	2	0	0	0
D, B	0	0	1	0
D, C	6	1	0	3
D, D	1	0	0	1
E, A	1	0	0	0
E, C	3	0	1	0
E, D	1	0	0	0
E, E	1	0	0	0
F, A	1	0	1	0
F, C	11	2	2	2
F, D	3	0	2	0
F, E	0	0	1	2
F, F	5	1	1	0
G, A	1	1	0	0
G, B	1	0	0	0
G, C	15	1	2	0
G, D	7	0	2	0
G, E	1	0	0	0
G, F	15	5	5	4
G, G	2	2	2	1
H, A	4	0	0	0
H, B	0	1	0	0
H, C	7	2	1	1
H, D	2	1	2	0
H, E	2	1	0	0
H, F	4	0	3	0
H, G	5	1	3	6
H, H	2	1	0	0
I, C	2	1	0	1
I, F	1	0	0	0
I, G	2	1	1	0
I, H	2	0	0	0
J, C	4	2	2	0
J, D	3	0	0	1
J, E	3	0	0	0
J, F	2	0	0	2
J, G	1	0	0	1

GENOTIPOS	POB. GEN	POB. SANA	POB. OPENIA	POB. OP
J, H	3	0	1	0
J, J	2	0	0	0
K, D	1	0	1	0
K, F	2	0	0	1
K, J	1	0	0	0
K, K	3	0	0	0
L, L	1	0	0	0
M, J	1	0	0	0
N, N	0	0	1	0
Q, N	0	0	1	0
S, S	0	0	0	1
	150	29	41	29