



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD.

**“ANALISIS DE POLIMORFISMOS GENETICOS ASOCIADOS A
OSTEOPOROSIS EN MUJERES POSMENOPAUSICAS DE ORIGEN
ETNICO MESTIZO-MEXICANO”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MC. DAVID ROJANO MEJIA

Tutora:

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Facultad de Medicina



MÉXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TUTORA:

DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

Adscripción: Unidad de Investigación en Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica.
Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE. Tel. 52005003 ext. 14603 o 14624. Correo: ipcanto@yahoo.com.mx

COMITÉ TUTORAL

DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

Adscripción: Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas
y Nutrición “Salvador Zubirán”. S.S. Teléfono y Fax: 56550011. Correo: canis@servidor.unam.mx

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

Adscripción: Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. Correo:
rmcoralv@prodigy.net.mx

AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber recibido una beca durante la realización de mis estudios de Doctorado y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Este trabajo pudo ser llevado a cabo por el financiamiento otorgado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, apoyo **PICDS083469693**.

Gracias a mi familia por todo su apoyo, especialmente a Fabiola y Daniel por toda su paciencia y comprensión.

A la Dra. Patricia Canto y al Dr. Ramón Coral, por permitirme compartir esta experiencia en el conocimiento, mi aprecio y cariño.

A mis compañeros y amigos que hicieron del trabajo en el laboratorio una agradable experiencia.

A todas las mujeres que participaron en el estudio, ya que sin ellas no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

INDICE

I	RESUMEN	4
II	MARCO TEORICO	6
	Epidemiología	6
	Factores de riesgo clínico	7
	Factores Genéticos	7
	Polimorfismos del gen de COLIA1	8
	Polimorfismo de LRP5	11
	Polimorfismos de OPG	12
III	JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV	PREGUNTA DE INVESTIGACION	15
V	OBJETIVO	16
VI	HIPOTESIS	17
VII	METODOLOGIA	18
	Sujetos	18
	Medición densidad mineral ósea	19
	Genotipificación	19
	Análisis Estadístico	20
VIII	CONSIDERACIONES ETICAS	21
IX	RESULTADOS	22
X	DISCUSION	27
XI	CONCLUSIONES	31
XII	REFERENCIAS	32
XIII	ANEXOS	36
XIV	PUBLICACION	40

I. RESUMEN

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A OSTEOPOROSIS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS DE ORIGEN ÉTNICO MESTIZO-MEXICANO

Introducción

La osteoporosis es una enfermedad multifactorial del sistema esquelético caracterizada por una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que se traduce en un incremento en la fragilidad ósea y un incremento en el riesgo de presentar fracturas. Los factores de riesgo clínicos para presentar una disminución en la DMO y fracturas por osteoporosis en mujeres posmenopáusicas son la edad avanzada, los aspectos genéticos, estilos de vida, índice de masa corporal menor a 21 kg/m² y estatus menopáusico. Los estudios llevados a cabo en familias y en gemelos han demostrado que los factores genéticos contribuyen aproximadamente del 60 al 85% de las variaciones en la DMO.

Dentro de los genes candidatos se han propuesto el gen *Colágena Tipo I $\alpha 1$* (*COL1A1*) el cual codifica para la cadena de colágeno alfa tipo 1, principal proteína estructural del hueso. El polimorfismo Sp1 *COL1A1*, G > T (rs1800012), afecta el sitio de unión del factor de transcripción Sp1, contribuyendo a una alteración en la fuerza ósea y a una disminución de la DMO en los portadores del alelo T. Otro polimorfismo identificado en el promotor de *COL1A1* rs1107946, se ha asociado estadísticamente significativa en la DMO en columna y cuello femoral, en mujeres posmenopáusicas españolas.

LRP5 en los osteoblastos, puede traducir señales canónicas para promover la diferenciación de células totipotenciales a osteoblastos, así como su replicación, e inhibición de apoptosis de osteoblastos y osteocitos, Por su rol importante en el desarrollo de la masa ósea, varios polimorfismos en *LRP5* han sido estudiados, buscando la asociación entre éstos y la DMO y fractura con resultados contradictorios.

OPG es un receptor señuelo para RANKL, que puede prevenir la interacción entre RANKL y RANK, lo cual inhibe los estadios terminales de la osteoclastogénesis, suprime la actividad de los osteoclastos maduros e induce apoptosis de los mismos. Con base en lo anterior, se ha postulado que *OPG* en un atractivo candidato involucrado en el desarrollo de la osteoporosis.

Justificación y planteamiento del problema

Diversos trabajos se han enfocado a estudiar la posible asociación entre el desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y polimorfismos en numerosos genes, con resultados diversos y la mayoría de estos estudios, han sido llevados a cabo principalmente en poblaciones sajonas y asiáticas; los resultados de asociación han sido contradictorios incluso entre poblaciones del mismo origen étnico. Por lo que al estudiar a la población mestiza-mexicana esperamos encontrar asociaciones de los polimorfismos con la DMO y osteoporosis en diferente magnitud a la reportada en otras poblaciones

Uno de los genes involucrados en la estructura ósea es el gen *Colágena Tipo I $\alpha 1$* (*COL1A1*) el cual codifica para la cadena de colágeno alfa tipo 1, siendo esta la principal proteína estructural del hueso, por lo que la búsqueda de polimorfismos en este gen es una buena opción para buscar marcadores de riesgo.

Por la participación importante de *LRP5* en la contribución de la masa ósea, varios polimorfismos en *LRP5* han sido estudiados, buscando la asociación con la DMO y fracturas con resultados contradictorios en diferentes poblaciones.

Otro gen candidato a estudiar en la población mestizo-mexicana, como posible marcador de riesgo individual (SNP) o en forma de haplotipos (varios SNPS) es la Osteoprotegerina ya que juega un rol importante como regulador de la reabsorción ósea, y considerando la inconsistencia demostrada en diferentes poblaciones con respecto a su asociación con la DMO y osteoporosis, es importante determinar su contribución en nuestra población.

Material y Métodos

Se realizó un estudio de transversal, descriptivo, analítico, ingresaron al estudio mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-mexicano que cumplieron los criterios de inclusión, posteriormente se les aplicó un cuestionario de factores de riesgo, se tomó una muestra de sangre de 4 ml, para extracción de ADN, y se realizó la densitometría ósea de cadera y columna. Posteriormente se determinaron las frecuencias de los polimorfismos y se buscó la asociación de polimorfismos y haplotipos con la DMO en columna y cadera.

Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG* de forma individual o en forma de haplotipos; con la DMO en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano?

Objetivo General

Analizar la asociación de los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG* de forma individual y en forma de haplotipos; con la DMO en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

Resultados

Obtuvimos una muestra de 750 mujeres posmenopáusicas de la Unidad de Medicina Familiar No. 20 del IMSS y del Hospital Regional Tacuba del ISSSTE de las cuales el 30.3% presento osteoporosis, 24.2% presentó una DMO normal y un 45.5% presento osteopenia. Encontramos que el polimorfismo rs1800012 de *COL1A1* se asoció a variaciones en la DMO en columna lumbar, con una diferencia promedio de 31 mg/cm², similar a lo reportado en otros estudios (RM= 1.36; IC 95%= 1.17- 1.57) [1-2]. En los polimorfismos rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618 y rs6993813 de *OPG* no se encontró asociación

Por otra parte, se identificó el haplotipo A-G-T de *OPG* asoció a una disminución en la DMO en columna lumbar promedio de 18 mg/cm².

II. MARCO TEORICO

La osteoporosis es una enfermedad del sistema esquelético caracterizada por una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que se traduce en un incremento en la fragilidad ósea y un riesgo aumentado de presentar fracturas. Cuando la patología es grave, las fracturas resultan de un traumatismo leve y son frecuentemente referidas como fracturas por fragilidad [3-4]

Epidemiología:

La prevalencia de osteoporosis y la incidencia de fracturas por osteoporosis, varían de acuerdo con la edad, sexo y el grupo étnico. Se ha estimado que en Estados Unidos 10 millones de personas mayores de 50 años presentan osteoporosis y al menos 34 millones están en riesgo de padecer esta enfermedad, mientras la mayoría de las personas menores de 50 años presentan una DMO normal, a los 80 años el 70 % presenta osteoporosis en cadera y columna, así también se ha reportado que el riesgo de presentar una fractura de fragilidad a lo largo de la vida en cadera es del 17.5%, columna 15.6% y en antebrazo distal 16%, datos similares se reportaron en han Inglaterra [5].

La prevalencia de osteoporosis en países en desarrollo es menos clara ya que hay pocos estudios que estimen la prevalencia, sin embargo hay claras diferencias étnicas, por ejemplo: los afroamericanos tienen mayor DMO que los caucásicos, los hispanos tienen una DMO similar a los caucásicos y los asiáticos tienen la DMO más baja[6], Morales-Torres usando los criterios de la OMS en un estudio de revisión, estimó que las mujeres latinoamericanas mayores de 50 años de edad presentaron osteoporosis vertebral en un 12 - 18% y osteoporosis en cadera en un 8 - 22% [7]. En México, Murillo-Uribe y cols. [8], estimaron la prevalencia de osteoporosis en mujeres mexicanas, población aparentemente sana, de más de 50 años de edad, en un 16% y un 57% para osteopenia. Clark et al, en 2010, estimaron la prevalencia de osteoporosis en mujeres mexicanas de más de 50 años, en un estudio en base a población encontrando 16 % en cadera y 17 % en columna lumbar [9].

México cursa una transición epidemiológica, en la cual el número de personas adultas mayores se está incrementando y se estima que se incremente el número de personas con osteoporosis y fracturas por la misma, los costos directos estimados para el tratamiento de fracturas relacionadas a osteoporosis en México en el 2006, fueron de \$97 millones de dólares, lo cual representa una carga significativa para el sistema de salud en México [10].

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, encontramos una prevalencia de osteoporosis de un 28%, la muestra fue de casos consecutivos de pacientes de la Unidad de Medicina Familiar No 20 del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Hospital Regional Tacuba del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, en mujeres aparentemente sanas posmenopáusicas [11].

Factores de Riesgo Clínicos:

Los factores de riesgo clínicos para presentar una disminución en la DMO y fracturas por osteoporosis en mujeres posmenopáusicas son la edad avanzada, los aspectos genéticos, estilos de vida, índice de masa corporal menor a 21 kg/m^2 y estatus menopáusico.

Edad: con el incremento en la edad el riesgo por fractura se incrementa, en general el riesgo se duplica cada 6 o 7 años después de los 50 años, basados únicamente en la DMO el riesgo de presentar fracturas se incrementa hasta 4 veces de los 55 años a los 85 años de edad [3].

Antecedente de fractura osteoporótica: Se ha establecido por medio de estudios de cohorte que el antecedente de una fractura osteoporótica incrementa el riesgo de futuras fracturas, un antecedente de fractura de muñeca se asocia con un incremento de casi dos veces la probabilidad de presentar otra fractura, el incremento en el riesgo de fractura puede ser atribuible en parte a la DMO en pacientes quienes han presentado fracturas. Sin embargo cuando el incremento de riesgo para presentar fracturas es ajustado por DMO el riesgo ajustado solo disminuye ligeramente (10%) lo cual se indica que las fracturas se asocian más a un defecto en la calidad del hueso más que a la DMO [12].

Estilos de Vida: diversos estilos de vida como la dieta insuficiente, insuficiente actividad física, tabaquismo, alcoholismo, índice de masa corporal menor de 21 Kg/m^2 y estatus posmenopáusicos incrementan el riesgo de presentar fracturas osteoporóticas [3].

Factores Genéticos

Se ha demostrado una gran Influencia hereditaria sobre el pico de masa ósea (Máxima DMO alcanzada durante la fase de desarrollo y maduración del esqueleto). Los estudios llevados a cabo en familias y en gemelos han demostrado que los factores genéticos contribuyen aproximadamente del 60 al 85% de las variaciones en la DMO, por ejemplo en mujeres de madres que han presentado una fractura osteoporótica presentan una densidad mineral ósea más baja que lo esperado para su edad, así también aquellas mujeres que tienen un familiar de primer grado (madre, hermana) presentan una DMO más baja que lo esperado para su

edad. Con base en lo anterior se han propuesto genes candidatos claves en el metabolismo óseo que podrían estar involucrados en el desarrollo de la osteoporosis y fracturas.[4, 13-16]. Una de las asociaciones impulsoras de los estudios a gran escala de marcadores genéticos para osteoporosis es la asociación llamada GENOMOS (Genetic Markers for Osteoporosis), la cual es pionera en la búsqueda de asociaciones de genes candidatos asociados con osteoporosis en Norteamérica y Europa con los tamaños de muestras más grandes reportados en la literatura, la cual hasta el momento ha identificado a 17 polimorfismos como marcadores de riesgo. Tabla 1

Tabla 1. Estudios de genes candidatos asociados a osteoporosis por GENOMOS

Genes (n = 6)	SNPs (n = 17)	Muestra n	Asociación con Fenotipos por Osteoporosis				Publicación
			DMO (DE)		Fractura (OR)		
			Cuello Femoral	Columna Lumbar	Vertebral	No vertebral	
<i>ESR1</i>	3	18,917	---	---	1.2 - 1.3	1.1 - 1.2	Ioannidis et al., JAMA 2004 [17]
<i>COL1A1</i>	1	20,786	0.15	0.15	1.1 (Sp1)	---	Ralston et al., PLoS Med 2006 [18]
<i>VDR</i>	5	26,242	---	---	1.1 (Cdx2)	---	Uitterlinden et al., Ann Int Med 2006[19]
<i>TGFβa</i>	5	28,924	---	---	---	---	Langdahl et al , Bone 2008 [20]
<i>LRP5</i>	2	37,760	0.15	0.15	1.12-1.26	1.06-1.14	Van Meurs et al., JAMA 2008[21]
<i>LRP6</i>	1	37,760	---	---	---	---	Van Meurs et al., JAMA 2008[21]

Polimorfismo en el gen de Colágena Tipo I $\alpha 1$

Se ha propuesto al gen *Colágena Tipo I $\alpha 1$* (*COL1A1*), como uno de los genes involucrados en el desarrollo de osteoporosis, este gen codifica para la cadena de colágeno alfa tipo 1, la cual es la principal proteína estructural del hueso [22]. Se ha descrito que mutaciones en los genes *COL1A1* y en *Colágena Tipo I $\alpha 2$* (*COL1A2*) son los responsables de más del 90% de los casos de la enfermedad mendeliana llamada osteogénesis imperfecta, la cual es asociada con una disminución en la DMO e incremento en el riesgo de presentar fracturas [15]. El polimorfismo más estudiado es el Sp1 *COL1A1, G > T* (rs1800012), el cual afecta el sitio de unión del factor de transcripción Sp1 y por consiguiente da lugar a un incremento en la expresión de colágeno tipo 1 $\alpha 1$ en la matriz ósea, lo que ocasiona la pérdida de equilibrio entre las cadenas de colágeno $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y de esa forma modifica la fuerza ósea y disminuye la DMO en los sujetos portadores del alelo T [1]. Efstathiadou y cols., [23] realizaron un meta análisis en el cual incluyeron 13 estudios con 3,641 sujetos, en el cual valoraron el riesgo de presentar osteoporosis asociados al alelo T, encontrando una razón de momios

(RM) de 1.25 (IC 95%, 1.09- 1.45) para el genotipo GT y una RM de 1.68 (IC 95%, 1.35 -2.10) para *TT*, demostrando un efecto dosis respuesta. Posteriormente, Ralston y cols. [18], analizaron 20,786 individuos de diferentes países europeos, encontrando que el genotipo *TT* en comparación con *GG* y *GT*, demostraba diferencias en la DMO de columna vertebral y cuello femoral de 21 y 25 mg/cm², respectivamente, sin embargo no se encontró asociación con el riesgo de presentar osteoporosis.

Tabla 2. Estudios de asociación entre el rs180012 y osteoporosis

Rs180012						
Año	Autor	Estudio	Sujetos	Raza	RM Fx.	DMO
2001	Efstathiadou y cols	Meta análisis	3641 sujetos 13 estudios	Norteamericanos Europeos	RM= 1.25 (1.09-1.45) <i>GT</i> RM=1.68 (1.35-2.10) <i>TT</i>	
2003	Ralston y cols.	Meta análisis	20786 sujetos	Europeos	No asociación con fracturas RM= 1.01 (0.95 a 1.08)	Cuello femoral: 25 mg/cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i> Columna lumbar: 21 mg/cm ² para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i>
2006	Stewart y cols.	Cohorte	3270	Inglaterra		Cuello Femoral: 35mg /cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i> Columna Lumbar: 27mg/cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i>
2007	Jiang y cols.	Descriptivo	605 1228	Caucásicos Chinos	<i>TT</i> se asocio a cambios geométricos y arquitectura en el hueso	
2007	Yazdanpanah y cols.	Cohorte	6280	Caucásicos	<i>TT</i> : RM= 2.3 (1.4 – 3.9)	Cuello Femoral: <i>TT</i> : 30mg /cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i>
2009	Ji,G y cols.	Meta análisis	2294 sujetos 16 estudios		<i>TT</i> : RM=1.97 (1.49 – 2.70) <i>GT</i> : RM= 1.18 (1.06 -1.31)	
2010	Jin H	Meta análisis	24511 sujetos 32 estudios	Caucásicos	<i>TT</i> : RM=1.34 (1.04 – 1.65)	Cuello Femoral: 16mg /cm ² mas bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i> Columna Lumbar: 13mg/cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT</i> / <i>GG</i>

García-Giralt y cols. [24], describieron otra variante en *COL1A1*, localizada en la posición -1997 del promotor (rs1107946), la cual se asociaba a variaciones en la DMO. Los autores observaron que las mujeres posmenopáusicas de origen étnico caucásico (específicamente españolas) con el alelo *T* de rs1107946, se asociaba en forma significativa a variaciones en la DMO en columna y cuello femoral. En forma adicional,

Stewart y cols. [22], estudiaron los polimorfismos rs1800012 y rs1107946; encontrando que los sujetos portadores del alelo *T* del rs1800012 y del alelo *T* del rs1107946; presentaban variaciones en forma significativa en la DMO en columna lumbar y en cuello femoral, respectivamente. Asimismo, el análisis de los haplotipos de ambos SNPs, demostró la presencia de tres bloques (*G-G*, *G-T* y *T-T*), de los cuales observaron que el haplotipo *TT*, se asociaba a una disminución en la DMO. Así también, Jiang y cols., [25] estudiaron 1,228 sujetos asiáticos, encontrando una asociación del alelo *T* del rs1800012 tanto con una disminución en la DMO como con cambios en la geometría ósea de cuello femoral y el rs1107946 se asoció únicamente con cambios en la geometría ósea del cuello femoral, pero no con DMO. Posteriormente, se analizó la asociación entre rs1107946 y rs1800012 con la DMO y el riesgo de presentar fracturas. Se observó que el alelo *T* de rs1800012 se asociaba a una disminución en la DMO de columna de aproximadamente 30 mg/cm²; sin embargo, no se encontró asociación con el rs1107946. El análisis de los haplotipos de ambos polimorfismos, evidenció que el haplotipo *G-T* se asociaba a la presencia de fracturas por fragilidad, RM: 2.1(IC 95%, 1.2- 3.7) [2].

Por otra parte, se han llevado a cabo meta análisis de los dos SNPs anteriores, observando una asociación entre rs1800012 y fracturas por fragilidad en mujeres caucásicas RM: 1.97 (IC 95%, 1.49 – 2.70) para *TT*, 1.18 (IC 95%, 1.06- 1.31) para *GT* y de 0.72 (IC 95%, 0.62 -0.84) para *GG*. Con base en lo anterior sugirieron que existía una asociación alelo dosis respuesta [26]. Asimismo, el estudio de meta análisis de los dos SNPs anteriores realizado por Jin y cols. [27], demostró que únicamente el alelo de riesgo *T* de rs1800012 se asociaba con una disminución promedio de 13 y 16 mg/cm² de la DMO en columna y cadera, respectivamente; y un riesgo en el incremento de presentar fracturas RM= 1.34 (1.01-1.77).

Tabla 3. Estudios de asociación entre el rs11079046 y osteoporosis

rs1107946						
Año	Autor	Estudio	Sujetos	Raza	RM Fx.	DMO
2002	García-Giralt, N.	Descriptivo	256	Españolas		Columna Lumbar: 67 mg/cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT/GG</i> /
2006	Stewart y cols.	Cohorte	3270	Inglaterra		Columna Lumbar: 42 mg/cm ² más bajo para <i>TT</i> vs <i>GT/GG</i> /
2007	Yazdanpanah y cols.	Cohorte	6280	Caucásicos	No asociación	No asociación
2010	Jin H	Meta análisis	24511 Sujetos 32 estudios	Caucásicos	No asociación	<i>TT</i> encontró una disminución de la DMO en portadores del genotipo <i>TT</i>

Tabla 4. Estudios de asociación entre haplotipos de colágena (rs1800012 y rs1107946) y osteoporosis

Haplotipos						
Año	Autor	Estudio	Sujetos	Raza	RM Fx.	DMO
2006	Stewart y cols.	Cohorte	3270	Inglaterra		Columna Lumbar: 40 mg/cm ² más bajo para GT vs GG/TG
2007	Yazdanpanah y cols.	Cohorte	6280	Caucásicos	GT: RM= 2.1 (1.2 -3.7)	

Polimorfismo en el gen del Receptor LDL Relacionado a la proteína 5 (LRP5)

Otro gen relacionado con el metabolismo y la masa ósea es el de el *Receptor LDL Relacionado a la Proteína 5 (LRP5)* [28], LRP5 es un miembro de la familia de los receptores de superficie celular involucrados en diversos procesos biológicos y actúa como correceptor para las señales canónicas de las proteínas WNT [29]. El gen de la *LRP5* en el humano se localiza en 11q13.4 y codifica para una proteína de 1616 aminoácidos (OMIM: #603506). Los estudios de ligamiento llevados a cabo en dos patologías raras del humano [síndrome de pseudoglioma-osteoporosis (OPPS) y el síndrome de densidad mineral ósea alta (HBM)], demostraron que *LRP5* es importante en la regulación de la masa ósea, ya que la presencia de mutaciones en este gen, pueden dar lugar tanto a osteoporosis severa de comienzo temprano, como a un incremento en la DMO [30-31].

Los estudios llevados a cabo en ratones nulos para *Lrp5*, demostraron que éstos, presentaban un fenotipo caracterizado por una disminución en la masa ósea, el cual es una fenocopia de la enfermedad OPPS del humano. El análisis de la histomorfometría de los ratones nulos para *Lrp5*, demostró que esa disminución en la masa ósea, más que un defecto en la reabsorción ósea, es secundaria a una disminución en la proliferación de los osteoblastos, así como a una reducción del depósito de la matriz ósea [31].

En los osteoblastos *LRP5*, puede traducir señales canónicas para promover la diferenciación de células totipotenciales a osteoblastos, así como su replicación, e inhibición de apoptosis de osteoblastos y osteocitos, debido a un incremento de la concentración de β -catenina, alterando la expresión de genes a través de factores de transcripción Lef/Tcf [32-33]. Por su rol importante en el desarrollo de la masa ósea, diversos polimorfismos en *LRP5* han sido estudiados, buscando la asociación entre éstos, la DMO y fractura con resultados contradictorios [16, 21, 34-39]. Uno de los SNPs más estudiados es el cambio en el nucleótido c.3989C>T, p.Ala1330Val (rs3736228). Se ha descrito en diversos estudios, que dicho polimorfismo (específicamente el cambio Val/Val) se encuentra asociado a una disminución en la DMO [16, 21, 36, 38-41]. Tran y cols. [42], realizaron un meta análisis, en el cual encontraron que el tener al menos un alelo de riesgo

condicionaba una disminución de la DMO en columna de 18 mg/cm² en caucásicos y asiáticos y de 11mg/cm² en cuello femoral solo en caucásicos. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación de este gen con variaciones en la DMO [34, 43].

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

El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK) y la osteoprotegerina (OPG) [44] (los cuales pertenecen a TNF, así como a la superfamilia de receptores TNF), representan un sistema novel de citocinas involucrados en la formación, fusión, sobrevivencia, activación y apoptosis de los osteoclastos. RANKL activa la diferenciación de los osteoclastos, incrementa la actividad de los osteoclastos maduros e inhibe la apoptosis de los mismos, a través de su unión a su receptor funcional RANK. OPG es un receptor señuelo para RANKL, que puede prevenir la interacción entre RANKL y RANK, lo cual inhibe los estadios terminales de la osteoclastogénesis, suprime la actividad de los osteoclastos maduros e induce apoptosis de los mismos [45]. Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que OPG es importante para la regulación del remodelamiento óseo. Los estudios llevados a cabo en ratones transgénicos, en los cuales se sobreexpresa *Opg*, demostraron que los ratones desarrollan osteopetrosis, mientras que los ratones nulos para *Opg*, desarrollan en forma temprana, osteoporosis severa. Asimismo, la administración exógena de OPG en ratones ovariectomizados, puede prevenir la pérdida ósea secundaria a dicho procedimiento [44]. Con base en lo anterior, se ha postulado que *OPG* es un atractivo candidato involucrado en el desarrollo de la osteoporosis.

Se han realizado diversos estudios de asociación entre polimorfismos del gen *OPG* ó *TNFRSF11B* (*Osteoprotegerina*) y variaciones en la DMO, en diferentes poblaciones con resultados contradictorios [16, 39, 46-54]. Uno de los polimorfismos más estudiados de este gen es el rs2073618 que involucra una transversión en el nucleótido 1181 de G por C, lo cual trae como consecuencia un cambio de lisina por una asparagina. Los diferentes estudios han demostrado que el alelo C se asocia con una disminución en la DMO en diferentes grupos étnicos, [50, 54-57] y recientemente Lee y cols., [53] realizaron un meta análisis, en el cual se incluyeron a poblaciones asiáticas y europeas, encontrando que el alelo C del rs2073618 se asocio a una disminución en la DMO en la columna lumbar en ambas poblaciones; sin embargo, al comparar la DMO en cuello femoral solo encontró diferencias en la población caucásica, lo cual pudiera sugerir que los polimorfismos tienen diferente magnitud y especificidad dependiendo de la población estudiada. Así también

Roshandel y cols. [58], encontraron una asociación de rs2073618 con la DMO y que el alelo de riesgo, se asocio con niveles más alto de productos de degradación del hueso, lo que sugiere que el efecto de este polimorfismo pudiera asociarse a la DMO debido a un efecto acelerado de la reabsorción ósea; sin embargo otros estudios no han demostrado dicha asociación [51,59-61]. En conclusión la información es contradictoria e inconsistente para estos polimorfismos.

Otro de los polimorfismos asociados a DMO es el rs4355801, el cual flanquea al gen de *OPG*. Este fue descrito por Richards y cols., en el 2008[39], al realizar un estudio de asociación con una población de 6463 individuos, encontrando que el alelo de riesgo condicionaba una disminución de 0.09 DE por cada alelo de riesgo y una RM de 1.2 (IC 95%, 1.01 -1.42) para presentar osteoporosis, resultados similares se encontraron por Paternoster y cols., [54]. Otro de los polimorfismos asociados a *OPG* es el rs6993813, ya que en un estudio de asociación en el cual se incluyeron 5861 individuos, observaron que el alelo de riesgo se asocio a una disminución en la densidad mineral ósea en columna y cadera [16]. En base a lo anterior podemos concluir que si se encuentra una asociación entre el alelo de riesgo de los polimorfismos de *OPG* y la DMO, pero es solo en los estudios con grandes poblaciones los que logran un poder estadístico suficiente, para determinar cambios mínimos en la DMO y el riesgo de presentar fracturas [53],[39].

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México cursa una transición epidemiológica, en la cual el número de personas adultas mayores se está incrementando, así como su expectativa de vida, de acuerdo a datos recientes del Consejo Nacional de la Población (CONAPO), la población de 60 años y más, es actualmente de 8.5 millones, y este número se incrementará en el 2050 a 33.8 millones. Por lo que con estos cambios esperamos tener un incremento en la prevalencia de osteoporosis e incidencia de fracturas en un futuro cercano. Lo anterior implica un problema de salud prioritario, que demanda la puesta en marcha de programas de diagnóstico, prevención y tratamiento oportuno, siendo el análisis de los polimorfismos genéticos una de las posibles estrategias a utilizar para éste fin, ya que en caso de encontrar un polimorfismo o la combinación de varios polimorfismos con una asociación fuerte, estos se podría utilizar como una prueba para predecir el riesgo de presentar osteoporosis o una disminución de la DMO aun en etapas tempranas. Diversos trabajos se han enfocado a estudiar la posible asociación entre el desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y polimorfismos en numerosos genes, con resultados diversos y la mayoría de estos estudios, han sido llevados a cabo principalmente en poblaciones sajonas y asiáticas e incluso entre poblaciones del mismo origen étnico, los resultados de asociación han sido contradictorios. Se ha propuesto que lo anterior es debido a las diferencias en el acervo genético y a los factores ambientales que interactúan.

En México, las poblaciones tienen un acervo genético distinto, determinado por el mestizaje que se dio entre las distintas etnias mexicanas con los españoles y algunos grupos de origen africano. Lo anterior sugiere, que dependiendo de las poblaciones humanas en estudio, los mismos marcadores genéticos vinculados con el desarrollo de una enfermedad podrían asociarse en forma diferente. Por lo que al estudiar a la población mestiza-Mexicana esperamos encontrar asociaciones de los polimorfismos con la osteoporosis con diferente magnitud a las reportadas en otras poblaciones

Uno de los genes involucrados en la estructura ósea es el gen *Colágena Tipo I $\alpha 1$ (COL1A1)* el cual codifica para la cadena de colágeno alfa tipo 1, siendo esta la principal proteína estructural del hueso, por lo que la búsqueda de polimorfismos en este gen representan una buena opción para buscar marcadores de riesgo, como se ha demostrado claramente con el rs1800012, el cual es uno de los más estudiados en diferentes poblaciones con resultados consistentes, y el rs1107946 en el que se ha demostrado asociación en algunos

estudios, por lo que podrían ser candidatos a marcadores de riesgo de forma individual o como haplotipos, asociados a una DMO baja u osteoporosis en la población mestizo-Mexicana.

Por la participación importante de *LRP5* en la contribución de la masa ósea, varios polimorfismos en *LRP5* han sido estudiados, buscando la asociación entre éstos y la DMO y fracturas con resultados contradictorios en diferentes poblaciones, sin embargo uno de los más estudiados y con resultados más reproducibles en diferentes poblaciones es el rs3736228, por lo que también podría ser un buen candidato como marcador de riesgo asociado a osteoporosis.

Otro gen candidato a estudiar en la población mestizo-mexicana, como posible marcador de riesgo individual (SNP) o en forma de haplotipos (varios SNPs) es la Osteoprotegerina ya que juega un rol importante como regulador de la reabsorción ósea, y considerando la inconsistencia demostrada en diferentes poblaciones con respecto a su asociación con la DMO y osteoporosis, es importante determinar su contribución en nuestra población.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG* de forma individual o en forma de haplotipos; con la DMO en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano?

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar la asociación de los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG* de forma individual y en forma de haplotipos; con la DMO en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-mexicano.

Objetivos específicos:

1. Comparar las diferencias de la DMO en columna, cadera total y cuello de fémur por genotipo de los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; rs3736228 de *LRP5*; rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG*.
2. Obtener los haplotipos individuales de rs1800012, rs1107946 de *COL1A1* y rs4355801, rs2073618, rs6993813 de *OPG* y posteriormente determinar la asociación con la DMO en columna lumbar, cadera total y cuello de fémur.

VI. HIPÓTESIS

Las mujeres posmenopáusicas que presenten el alelo de riesgo de alguno de los polimorfismos a estudiar o en forma de haplotipos presentarán una disminución en la DMO en mujeres posmenopáusicas de origen étnico mestizo-Mexicano.

VII. METODOLOGÍA

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y analítico.

Sujetos: Se tomó una muestra de mujeres voluntarias sanas de origen étnico mestizo-Mexicano, posmenopáusicas de la Unidad de Medicina Familiar No 20 del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Hospital Regional Tacuba del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado obtenidas de forma consecutiva, en el periodo de Marzo del 2009 a julio del 2010, se realizó un cuestionario de factores de riesgo (anexo 1) y posteriormente se realizó la densitometría ósea.

Criterios de inclusión:

1. Aceptaran participar en el estudio y firmaran la carta de consentimiento informado.
2. Origen étnico mestizo-Mexicano: persona que haya nacido en México, que tenga un apellido derivado del español y que tenga antecedentes familiares de al menos 3 generaciones atrás nacidas en México.
3. Cese de menstruación de más de 12 meses.
4. Mayores de 40 años.

Criterios de exclusión:

1. Mujeres posmenopáusicas que hayan tomado fármacos que pudieran afectar el recambio óseo (corticoesteroides, anticonvulsivantes o heparina).
2. Mujeres con antecedente quirúrgico de histerectomía.
3. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades que afecten el metabolismo óseo (relacionadas con alteraciones de la hormona paratiroides, diabetes mellitus, enfermedades hepáticas, falla renal y displasias óseas).
4. Mujeres posmenopáusicas con antecedentes de enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo de la vitamina D.
5. Ooforectomía bilateral antes de los 45 años de edad.
6. Menopausia antes de los 40 años.

Criterios de eliminación:

1. Mujeres cuyas muestra de DNA presente mala calidad (absorbancia 260/280 menor a 1.8, así como degradación de DNA observado en el gel de agarosa).
2. Que no se tengan los datos completos de la hoja de captura de datos.

Medición de la DMO:

La DMO (gr/cm^2) fue medida en cadera total (trocánter, área intertrocanterica, triangulo de Ward, y cuello femoral) y columna lumbar (L2 - L4) por medio de absorciometría dual de rayos X (DEXA) (Hologic QDR 4500; Hologic Inc., Waltham, MA, USA), Utilizamos la puntuación de T para analizar la DMO. La cual es la desviación de la DMO promedio, ajustada al peso, raza de la población latinoamericana sana. El estudio se realizó por un técnico certificado por “The International Society for Clinical Densitometry” específicamente por “Clinical Densitometrist” ,la sensibilidad del equipo fue verificada todos los días usando un fantasma antropométrico el cual fue proporcionado por el fabricante. El coeficiente de variación fue menor del 1.5% en columna y cadera, cumpliendo con los controles de calidad requeridos internacionalmente [62].

Genotipificación:

El DNA fue aislado de los leucocitos por el método de sales, descrito por Miller[63], el análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) fue desarrollado usando discriminación alélica por PCR en tiempo real, usando ensayos TaqMan (Applied Biosistem). Todas las reacciones de PCR contenían 20 ng de DNA, 5 μl de Master Mix Universal (AB)(2x), 0.25 μl primers y sondas (10X) y agua para un volumen final de 10 μl . PCR en tiempo real fue realizada en un ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems,Foster City,CA,USA) las condiciones para todos los SNP fueron 95°C por 10 min, y 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 segundos y 62°C por un minuto. En cada ciclo el software determino la señal de fluorescencia de las sondas marcadas con los fluoroforos VIC o FAM (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA), para la determinación de los SNPs utilizamos sondas y primers diseñados por applied biosystems, para COLA1 estudiamos los polimorfismos rs 1800012, ensayo con ID: C__7477170_30, rs1107946 ensayo con ID: C__7477171_10, para LRP5 estudiamos el polimorfismo rs3736228, utilizando el ensayo con ID: C__25752205_10, para OPG estudiamos los polimorfismos rs4355801 ensayo con ID: C__11869235_10,rs2073618 ensayo con ID: C__1971047_1_,rs6993813 ensayo con ID: C__1968538_10.

Análisis estadístico:

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

Estadística descriptiva:

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

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

Estadística Inferencial:

Se utilizó Anova de una vía, para comparar las diferencias entre los factores de riesgo clínicos estudiados y los genotipos de cada uno de los polimorfismos del estudio, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en alguno de ellos, por lo que se puede concluir que el aspecto genético es un factor independiente de los factores ambientales para estos polimorfismos, por lo que el análisis estadístico se hizo tomando el factor genético como un factor independiente, sin necesidad de ajustar por algún factor de riesgo clínico, sin embargo se hizo análisis estratificado por edad, para ver la tendencia de el efecto del polimorfismo conforme avanza la edad.

Asociación de los polimorfismos y la DMO: Comparamos las diferencias de la DMO en columna, cadera total y cuello de fémur por genotipo de los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de *COL1A1*; 3736228 de *LRP5*; 4355801, 2073618, 6993813 de *OPG*, usando ANOVA de una vía, en el caso del polimorfismo rs1800012 al encontrar una frecuencia del genotipo TT del 1.2 % se decidió utilizar un modelo dominante, es decir se toma como un grupo el genotipo GG y por otro se toma GT y TT.

Asociación de haplotipos de *OPG*, *COL1A1* y *DMO*: utilizamos el programa PHASE 2.02 para obtener los haplotipos individuales, y posteriormente en SPSS se realizó la asociación entre haplotipos y DMO.

VIII. Consideraciones éticas

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su artículo 17 el presente estudio se considera una investigación con riesgo mínimo. El estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica tanto del Instituto Mexicano del Seguro Social como del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” y del Hospital Regional Tacuba, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado y se solicitó el consentimiento a todas las participantes en el estudio (anexo 2).

IX. RESULTADOS

Obtuvimos una muestra de 750 mujeres posmenopáusicas, de las cuales el 24.2% presentó una densidad mineral ósea normal, 30.3% presentó osteoporosis y un 45.5% presentó osteopenia. Las características generales de la población se muestran en la tabla 5.

Tabla.5 Características generales de la población (n 750)

Variable	Media (DE)
Edad (años)	60.0 (7.55)
Estatura (cm)	1.51 (0.59)
Peso (kg)	67.43 (11.7)
IMC (kg/m ²)	29.25 (4.8)
DMO cuello de femur (g/cm ²)	.742(.123)
DMO Columna Lumbar (g/ cm ²)	.849 (.139)
No. of Hijos	3.5 (2.4)
Duración de la lactancia (meses)	25 (33)
Años posterior a la menopausia	11.7 (8.3)
Uso de estrógenos	111 (14.8%)
Antecedente de fractura	116 (15.5%)
Tabaquismo	116 (15.5%)
Ejercicio de forma regular.	250 (33.5%)

Con respecto a las frecuencias genotípicas, alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg se describe en la tabla 6 para los polimorfismos de *COL1A1* y *LRP5* y tabla 7 para los polimorfismos de *OPG*.

Tabla 6. Frecuencia Genotípica, Alélica y Equilibrio de Hardy-Weinberg en los polimorfismos rs1800012, rs1107946 de COL1A1, rs3736228 de LRP5

SNP dbSNP	COL1A1			COL1A1			LRP5		
Número de referencia SNP	rs1800012			rs1107946			rs3736228		
	Genotipo	N	%	Genotipo	N	%	Genotipo	N	%
Distribución Genotípica	GG	635	84.7	GG	380	50.7	CC	476	63.5
	GT	106	14.1	GT	298	39.7	CT	240	32
	TT	9	1.2	TT	72	9.6	TT	34	4.5
Frecuencia Alélica	G	0.92		G	0.71		C	0.79	
	T	0.08		T	0.29		T	0.21	
Hardy-Weinberg	P= > 0.05			P = > 0.05			P=>0.05		

Tabla 7. Frecuencia Genotípica, Alélica y Equilibrio de Hardy-Weinberg en los polimorfismos rs4355801, rs2073618, rs6993813 de OPG

GEN	OPG			OPG			OPG		
Número de referencia SNP	rs4355801			rs2073618			rs6993813		
	Genotipo	N	%	Genotipo	N	%	Genotipo	N	%
Distribución Genotípica	AG	381	50.8	CG	383	51.1	CT	369	49.2
	GG	185	24.7	GG	243	32.4	TT	193	25.7
	AA	184	24.5	CC	124	16.5	CC	188	25.1
Frecuencia alélica	G	0.5		G	0.58		T	0.5	
	A	0.5		C	0.42		C	0.5	
Hardy-Weinberg	P=>0.05			p=>0.05			P=>0.05		

Asociación de genotipos de los polimorfismos y la densidad mineral ósea:

Observamos que el polimorfismo rs1800012 de COL1A1 se asoció a variaciones en columna lumbar, con una diferencia promedio de 31 mg/cm². En los polimorfismos rs1107946 de COL1A1; 3736228 de LRP5; 4355801, 2073618, 6993813 de OPG no se encontró asociación (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación del genotipo con la densidad mineral ósea.

	Genotipo	Columna		Cadera		Cuello fémur	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
	<i>G/G</i>	0.854	0.141	0.915	0.137	745	126
*rs1800012	<i>G/T T/T</i>	0.823	0.126	0.908	0.13	725	101
		p=0.029		p=0.711		p=0.245	
	<i>G/G</i>	0.856	0.136	0.917	0.135	0.745	0.126
rs1107946	<i>G/T</i>	0.841	0.143	0.91	0.134	0.727	0.053
	<i>T/T</i>	0.848	0.139	0.908	0.147	0.724	0.104
		p=0.200		p=0.522		p= 0.124	
	<i>C/C</i>	0.863	0.138	0.92	0.134	0.743	0.126
rs3736228	<i>C/T</i>	0.837	0.139	0.898	0.139	0.736	0.115
	<i>T/T</i>	0.832	0.153	0.931	0.143	0.766	0.130
		p= 0.196		p= 0.241		p= 0.479	
	<i>G/G</i>	0.842	0.146	0.923	0.148	0.747	0.113
rs4355801	<i>G/A</i>	0.825	0.144	0.911	0.131	0.737	0.12
	<i>A/A</i>	0.853	0.123	0.91	0.132	0.746	0.138
		p= 0.591		p= 0. 518		p= 0.819	
	<i>G/G</i>	0.86	0.13	0.911	0.124	0.748	0.107
rs2073618	<i>C/G</i>	0.851	0.142	0.91	0.138	0.736	0.124
	<i>C/C</i>	0.842	0.151	0.929	0.153	0.747	0.147
		p= .356		p=.674		p= 0.978	
	<i>T/T</i>	0.853	0.123	0.91	0.132	0.737	0.116
rs6993813	<i>C/T</i>	0.852	0.144	0.911	0.131	0.738	0.117
	<i>C/C</i>	0.841	0.146	0.923	0.148	0.753	0.141
		p= 0.441		p= 0.596		p= 0.323	

En donde DE= desviación estándar. Se tomó una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa. * En rs1800012 por la baja frecuencia del genotipo TT (1.2%) se decidió utilizar un modelo Dominante (GG vs GT/TT)

Asociación de haplotipos de COL1A1 y DMO

Se realizó el análisis de haplotipos entre el rs1800012 y rs1107946 de *COL1A1*, los cuales se encontraron en desequilibrio de ligamiento $D' = 0.84$, obteniendo tres haplotipos *G-G*, *G-T* y *T-G*, con una frecuencia de 62.6%, 29.1% y 7.9%, respectivamente. Una vez obteniendo los haplotipos individuales se realizó la asociación entre haplotipos y DMO en columna lumbar, cadera total y cuello femoral, encontrando una diferencia significativa en columna lumbar (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de haplotipos de COL1A1 y DMO

Haplotipo	Columna Lumbar			Cadera Total		Cuello Femoral	
	N	Media DMO	DE	Media DMO	DE	Media DMO	DE
GG	936	.856	.140	.917	.136	.747	.126
GT	441	.844	.142	.910	.139	.736	.123
TG	123	.822	.125	.908	.128	.724	.099
		*p= 0.022		p= 0.624		p= 0.071	

En donde DE= desviación estándar; DMO= densidad mineral ósea. *Se tomó una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

Asociación de haplotipos de OPG y DMO

Para los tres polimorfismos estudiados se encontraron 8 haplotipos: *G-G-T*, *A-C-C*, *A-G-T*, *G-C-C*, *A-G-C*, *A-C-T* y *G-C-T*, con una frecuencia de 28.8%, 25.1%, **16.9%**, 12.41%, 6.7%, 5.3% y 2.4%, respectivamente. Se identificó el haplotipo *A-G-T* asociado a una DMO baja en columna lumbar, con una disminución promedio de 18 mg/cm², en cadera y cuello femoral no se encontró asociación

Tabla 10. Haplotipos de OPG asociados con DMO.

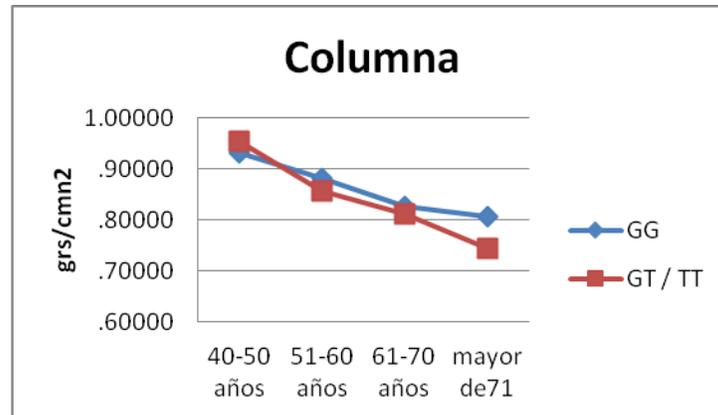
Haplotipo			Media	DE	Valor P
DMO	CL	Otros	0.852	0.142	0.030
(grs/cm ²)		AGT	0.834	0.121	
DMO	CT	Otros	0.914	0.137	0.279
(grs/cm ²)		AGT	0.910	0.128	
DMO	CF	Otros	0.745	0.125	0.174
(grs/cm ²)		AGT	0.722	0.112	

En donde DE= desviación estándar; DMO= densidad mineral ósea; CL= columna lumbar; CT= cadera total; CF= cuello femoral. Se tomó una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

Asociación de la edad con la DMO en mujeres con el alelo de riesgo.

Se realizó la estratificación de la población por edad, grupos de 10 años, con la finalidad de ver el efecto de cada uno de los polimorfismos estudiados así como de los haplotipos en la DMO conforme avanza la edad, encontramos esta tendencia únicamente en el rs1800012 específicamente en columna lumbar a partir de los 71 años en los pacientes con el alelo de riesgo, siendo esta diferencia no significativa estadísticamente. Fig. 1

Fig. 1, asociación de la edad con la DMO en mujeres con el alelo de riesgo del rs1800012



X. DISCUSION

Uno de los polimorfismos más consistentes asociados a la disminución de la DMO, es el rs1800012 de *COL1A1*. En forma similar a lo descrito en diversas poblaciones [2, 18, 22-23, 26, 64], este polimorfismo afecta el sitio de unión del factor de transcripción Sp1 y por consiguiente da lugar a un incremento en la expresión de colágeno tipo 1 $\alpha 1$ en la matriz ósea, lo que ocasiona la pérdida de equilibrio entre las cadenas de colágeno $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y de esa forma modifica la fuerza ósea y disminuye la DMO en los sujetos portadores del alelo T [1-2], al igual que lo reportado previamente encontramos una asociación del alelo T de rs1800012 con una disminución en la DMO, y ésta fue en promedio de 30 mg/cm² en columna lumbar (RM= 1.36; IC 95%, 1.17- 1.57). A diferencia de otros estudios descritos en la literatura [2, 18, 22, 27, 64], no encontramos asociación significativa en la disminución de la DMO en cadera total; no obstante, si observamos una tendencia en la disminución de ésta, en mujeres portadoras del alelo T (con una diferencia media de 20mg/cm²).

En relación a los resultados obtenidos del polimorfismo rs1107946 de *COL1A*, no encontramos asociación de dicho polimorfismo y variaciones en la DMO en columna o cadera, lo cual esta de acorde a lo descrito por Yazdanpanah y cols., [2], pero diferente a los reportado por otros investigadores [22, 24]. La discrepancia en nuestros resultados y lo descrito previamente en otras poblaciones, puede ser debido a las limitaciones en el poder estadístico para detectar cambios menores de 30 mg/cm² en cadera total o cuello femoral en nuestra muestra, por lo cual, no se descarta una posible asociación.

De igual forma a lo descrito previamente [2, 22], observamos que el análisis de los haplotipos de los dos polimorfismos de *COL1A1* (rs1800012 y rs1107946) se asociaron con variaciones en la DMO, específicamente los haplotipos T-G y G-T en comparación con G-G presentaron una diferencia media de 34 mg/cm² y 22 mg/cm², respectivamente en columna lumbar y 23 mg/cm² y 12 mg/cm² en cuello femoral. Es importante remarcar, que el análisis de haplotipos nos permitió encontrar una diferencia significativa en la DMO solo en columna lumbar.

Con respecto a *LRP5* y su relación con variaciones en la DMO, el SNP más estudiado es el rs3736228, sin embargo los resultados han sido contradictorios. Los estudios de asociación con un gran poder estadístico como los realizados por Richards, [39] y van Meurs [21], en el cual se incluyeron más de 6,463 y 37,000

individuos, respectivamente, tienen la ventaja de poder encontrar diferencias tan mínimas en la DMO como 8 mg/cm² en cuello femoral y en columna de 14 mg /cm² por cada alelo de riesgo.

Urano y cols., [38] realizaron experimentos *in vitro* en donde las células HEK293T portadoras del aminoácido valina (polimórfico) en el codón 1330 en presencia de Wnt3a, presentaron una actividad disminuida en comparación con el aminoácido alanina (silvestre), demostrando así la funcionalidad del polimorfismo. Posteriormente, en una muestra de 739 mujeres posmenopáusicas, el mismo grupo de investigación llevó a cabo la asociación entre el polimorfismo anterior y la DMO, encontrando una disminución en DMO en las portadoras de valina [38].

En forma contradictoria otros autores [34-35,43] no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la asociación de la DMO y genotipo de LRP5; resultados similares a los nuestros. Sin embargo si encontramos una tendencia en la disminución de la DMO en columna y el alelo de riesgo; los resultados anteriores pudieran ser secundario a la falta de poder estadístico debido al tamaño de la muestra. Con respecto a *OPG*, analizamos en forma individual tres polimorfismos (rs4355801, rs2073618 y rs6993813) así como sus haplotipos y DMO. Diversos estudios han analizado la relación de esos tres polimorfismos pero en reportes independientes [16, 39, 65]; es decir, en una misma investigación no se habían estudiado los tres SNPs juntos y por lo tanto, tampoco los haplotipos derivados de esos tres polimorfismos. No encontramos asociación individual de ninguno de los polimorfismos estudiados, pero sí observamos que el haplotipo *A-G-T* se asoció a una disminución promedio de 18 mg/cm² de la DMO en columna lumbar en comparación con los otros haplotipos. Con el fin de conocer si estos tres polimorfismos en nuestra población segregan juntos, llevamos a cabo el análisis del desequilibrio de ligamiento (LD), observando que los polimorfismos rs2073618 y rs6993813 presentaron un LD bajo ($r^2 = 0.45$), lo cual es similar a lo descrito en la población caucásica ($r^2 = 0.44$) [16]. Por otra lado, el valor de LD entre rs4355801 y rs6993813 fue significativamente diferente ($r^2=0.03$) al de la población caucásica ($r^2=0.6$) [54]; lo que quiere decir que no se encuentran en desequilibrio de ligamiento y por lo tanto estos polimorfismos no segregan juntos. Lo anterior podría deberse, a que a los mestizo-Mexicanos somos un grupo poblacional relativamente joven, por lo que estas dos variantes genéticas (rs2073618 y rs693813) pertenecen a un bloque y el rs4355802 pertenece a otro bloque genético, en el cual se encuentre algún SNP o región que se asocie a la DMO. A pesar de que un polimorfismo es intragénico (rs6993813) y otro es localizado en la región no traducida 3' de *OPG* (rs4355801), Hsu y cols. [66],

propusieron que estos polimorfismos podrían estar tanto en LD con las variantes causales o estar localizados dentro o cerca de elementos reguladores de la transcripción.

Richards y cols. [34], analizaron el polimorfismo rs4355801 en mujeres caucásicas, observando una asociación con la DMO, osteoporosis y la expresión de osteoprotegerina. Los autores encontraron que el alelo de riesgo A, se asoció con una disminución significativa en columna lumbar y cuello femoral y el alelo G se asoció a un incremento en la disminución de la DMO; de igual forma, observaron que el alelo de riesgo A, afectaba los patrones de expresión del transcrito de *OPG*. En nuestro estudio hallamos una frecuencia alélica similar, sin embargo no se encontró asociación.

Styrkarsdottir y cols. [16], con el fin de establecer si las variantes genéticas previamente reportadas en población europea, también se asociaba a variaciones en la DMO en población asiática, realizaron un estudio de varios polimorfismos en diferentes genes, el cual incluyó el polimorfismo rs4355801 y rs6993813 de *OPG*. Los autores encontraron que estos dos polimorfismos presentaban asociación con DMO de columna lumbar más que con la DMO de cadera. Asimismo, Paternoster y cols. [54], analizaron los mismos SNPs descritos arriba, pero una población de hombres jóvenes de origen caucásico, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre el rs4355801 y DMO cortical.

Por otra parte, se han realizado diversos estudios en diferentes poblaciones, con el fin de establecer asociación entre el polimorfismo rs2073618 y DMO con resultados contradictorios, inclusive entre el mismo grupo étnico, los resultados son inconsistentes [51-52, 54, 58, 67]; sin embargo, estas diferencias pueden ser debidas al reducido tamaño de la muestra y a el poder limitado de los estudios de forma individual para detectar diferencias mínimas significativas. Lee en el 2010 [53], realizó un meta análisis del polimorfismo rs2073618, encontrando que el genotipo *GG* mostró una disminución en la DMO de columna de 51 mg/cm² comparado contra *CC*, y de 18 mg/cm² comparado con *GC* en columna lumbar. Por otro lado, en el cuello femoral solo se encontró asociación en población caucásica, por lo que se puede inferir que hay diferencias étnicas en la asociación de los polimorfismos en las diferentes poblaciones. En nuestro estudio, el genotipo *GG* a diferencia de lo reportado previamente, mostró un aumento en la DMO, sin embargo no alcanzo significancia estadística.

La variación en nuestros resultados con respecto a lo reportado en otras poblaciones previamente con relación a la DMO, osteoporosis y riesgo de presentar fracturas, sugiere que dependiendo de las poblaciones humanas

en estudio, los mismos marcadores genéticos vinculados con el desarrollo de una enfermedad, podrían asociarse con diferente magnitud y especificidad, debido a la variación en sus componentes genéticos diferentes, por ejemplo para la presentación de fracturas no solo interviene la DMO si no también otros componentes como la calidad y geometría del hueso, la cual ha demostrado ser diferente dependiendo del grupo étnico, así también la posible interacción de factores clínicos conocidos y no conocidos que pudieran interaccionar con el acervo genético condicionando alteraciones en la DMO; no se encontró interacción con los factores de riesgo clínico estudiados con los polimorfismos estudiados; sin embargo no se puede concluir que realmente los polimorfismos estudiados tengan una magnitud diferente a otras poblaciones ya que hay una gran heterogeneidad en los estudios, por la metodología, tipo de estudio y las limitaciones del poder estadístico para detectar diferencias menores a 30 mg/cm^2 , en la mayoría de los estudios. [68]. Por lo que sería recomendable realizar investigaciones multicéntricas con el fin de estudiar a un mayor número de personas, optimizar recursos y estudiar más de genes asociados con la regulación, metabolismo y estructura del hueso, con el fin de encontrar algún marcador de riesgo asociado a la DMO, a osteoporosis y al riesgo de presentar fracturas, al momento se sabe que en el INMEGEN se están realizando estudios de marcadores genéticos para osteoporosis, así como en el Instituto Nacional de Rehabilitación, por lo que en un futuro no descarta la posibilidad de formar grupos inter institucionales.

XI. CONCLUSIONES

- El presentar al menos un alelo de riesgo de rs180012 de *COL1A1*, se asocia con una disminución en la DMO en columna lumbar, con un promedio de 31 mg/cm² (RM= 1.36; IC 95%= 1.17- 1.57).
- Se observó que el genotipo Val/Val de rs3736228 de *LRP5*, presenta una tendencia en la disminución en la DMO en columna lumbar, la cual es de 31 mg/cm² en comparación con Ala/Ala, sin embargo no se encontró una diferencia estadística entre grupos.
- El análisis individual de los polimorfismos: rs4355801, rs2073618 y rs6993813 de *OPG* no se asoció de con variaciones en la DMO; sin embargo, el análisis de los haplotipos de esos SNPs, en especial *A-G-T*, si se asoció con una disminución en la DMO en columna lumbar promedio de 18 mg/cm².
- Limitaciones del estudio: Uno de los factores que pudo contribuir con la no obtención de una asociación estadísticamente significativa en la mayoría de los polimorfismos fue el tamaño de la muestra, para el estudio calculamos un tamaño de la muestra buscando encontrar una diferencia mínima entre genotipos de 30 mg/cm², sin embargo en la mayoría de los polimorfismos las diferencias son mucho más pequeñas y con el tamaño de la muestra estimado fue difícil alcanzar el poder estadístico para encontrar asociaciones menores de 30 mg/cm².

XII. REFERENCIAS

1. Grant, S.F., et al., *Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 203-5.
2. Yazdanpanah, N., et al., *The -1997 G/T and Sp1 polymorphisms in the collagen type I alpha 1 (COL1A1) gene in relation to changes in femoral neck bone mineral density and the risk of fracture in the elderly: the Rotterdam study*. Calcif Tissue Int, 2007. **81**(1): p. 18-25.
3. Prevention, N.C.D.P.o.O., *Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy*. JAMA, 2001. **285**(6): p. 785-95.
4. Ralston, S.H. and B. de Crombrugge, *Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis*. Genes Dev, 2006. **20**(18): p. 2492-506.
5. Holroyd, C., C. Cooper, and E. Dennison, *Epidemiology of osteoporosis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(5): p. 671-85.
6. Handa, R., A. Ali Kalla, and G. Maalouf, *Osteoporosis in developing countries*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. **22**(4): p. 693-708.
7. Morales-Torres, J. and S. Gutierrez-Urena, *The burden of osteoporosis in Latin America*. Osteoporos Int, 2004. **15**(8): p. 625-32.
8. Murrillo-Urbe, A., et al., *[Osteoporosis in Mexican postmenopausal women. Magnitude of the problem. Multicenter study]*. Ginecol Obstet Mex, 1999. **67**: p. 227-33.
9. Clark, P., F. Carlos, and J.L.V. Martínez, *Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico*. Arch Osteoporos, 2010. **5**(1-2): p. 9-17.
10. Carlos, F., et al., *Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican Social Insurance Health Care System*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 1**: p. S108-13.
11. Rojano-Mejia, D., et al., *Risk factors and impact on bone mineral density in postmenopausal Mexican mestizo women*. Menopause, 2010.
12. Cummings, S.R. and L.J. Melton, *Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures*. Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1761-7.
13. Howard, G.M., et al., *Genetic and environmental contributions to the association between quantitative ultrasound and bone mineral density measurements: a twin study*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(8): p. 1318-27.
14. Peacock, M., et al., *Genetics of osteoporosis*. Endocr Rev, 2002. **23**(3): p. 303-26.
15. Zhao, H.Y., et al., *[Study of the impact of candidate genes on bone mineral density in postmenopausal women]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2005. **40**(12): p. 803-7.
16. Stykarsdottir, U., et al., *Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures*. N Engl J Med, 2008. **358**(22): p. 2355-65.
17. Ioannidis, J.P., et al., *Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes*. JAMA, 2004. **292**(17): p. 2105-14.
18. Ralston, S.H., et al., *Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study*. PLoS Med, 2006. **3**(4): p. e90.
19. Uitterlinden, A.G., et al., *The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis*. Ann Intern Med, 2006. **145**(4): p. 255-64.

20. Langdahl, B.L., et al., *Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study*. Bone, 2008. **42**(5): p. 969-81.
21. van Meurs, J.B., et al., *Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis*. JAMA, 2008. **299**(11): p. 1277-90.
22. Stewart, T.L., et al., *Haplotypes defined by promoter and intron 1 polymorphisms of the COL1A1 gene regulate bone mineral density in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(9): p. 3575-83.
23. Efstathiadou, Z., A. Tsatsoulis, and J.P. Ioannidis, *Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(9): p. 1586-92.
24. Garcia-Giralt, N., et al., *Two new single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(3): p. 384-93.
25. Jiang, H., et al., *Association and linkage analysis of COL1A1 and AHSG gene polymorphisms with femoral neck bone geometric parameters in both Caucasian and Chinese nuclear families*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(3): p. 375-81.
26. Ji, G.R., et al., *Association of collagen type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism with osteoporotic fracture in Caucasian post-menopausal women: a meta-analysis*. J Int Med Res, 2009. **37**(6): p. 1725-32.
27. Jin, H., et al., *Polymorphisms in the 5' flank of COL1A1 gene and osteoporosis: meta-analysis of published studies*. Osteoporos Int, 2011. **22**(3): p. 911-21.
28. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
29. Tamai, K., et al., *LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 530-5.
30. Little, R.D., et al., *A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(1): p. 11-9.
31. Kato, M., et al., *Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor*. J Cell Biol, 2002. **157**(2): p. 303-14.
32. Johnson, M.L., et al., *LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(11): p. 1749-57.
33. Balemans, W. and W. Van Hul, *The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2622-9.
34. Koh, J.M., et al., *Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men*. J Korean Med Sci, 2004. **19**(3): p. 407-12.
35. Mizuguchi, T., et al., *LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density*. J Hum Genet, 2004. **49**(2): p. 80-6.
36. van Meurs, J.B., et al., *Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(1): p. 141-50.

37. Xiong, D.H., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene polymorphisms are associated with bone mass in both Chinese and whites*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(3): p. 385-93.
38. Urano, T., et al., *A1330V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decreases Wnt signaling and affects the total body bone mineral density in Japanese women*. Endocr J, 2009. **56**(4): p. 625-31.
39. Richards, J.B., et al., *Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study*. Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1505-12.
40. Saarinen, A., et al., *The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men*. Bone, 2007. **40**(4): p. 1006-12.
41. Ezura, Y., et al., *Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women*. Bone, 2007. **40**(4): p. 997-1005.
42. Tran, B.N., et al., *Association between LRP5 polymorphism and bone mineral density: a Bayesian meta-analysis*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 55.
43. Agueda, L., et al., *A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(12): p. 1954-63.
44. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
45. Vega, D., N.M. Maalouf, and K. Sakhaee, *CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4514-21.
46. Arko, B., et al., *Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4080-4.
47. Langdahl, B.L., et al., *Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(7): p. 1245-55.
48. Brandstrom, H., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women*. Calcif Tissue Int, 2004. **74**(1): p. 18-24.
49. Cheng, Q., et al., *[Effect of osteoprotegerin gene polymorphism on bone mass in postmenopausal women]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2004. **84**(4): p. 274-7.
50. Arko, B., et al., *Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women*. Maturitas, 2005. **51**(3): p. 270-9.
51. Ueland, T., et al., *No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women*. Bone, 2007. **40**(1): p. 175-81.
52. Moffett, S.P., et al., *Osteoprotegerin Lys3Asn polymorphism and the risk of fracture in older women*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 2002-8.
53. Lee, Y.H., et al., *Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(1): p. 227-34.
54. Paternoster, L., et al., *OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and gothenburg osteoporosis and obesity determinants cohorts*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(8): p. 3940-8.

55. Kim, J.G., et al., *Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women.* *Menopause*, 2007. **14**(5): p. 913-8.
56. Zhao, H.Y., et al., *The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women.* *Osteoporos Int*, 2005. **16**(12): p. 1519-24.
57. Garcia-Unzueta, M.T., et al., *Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density.* *Horm Metab Res*, 2008. **40**(3): p. 219-24.
58. Roshandel, D., et al., *Genetic variation in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway is associated with bone turnover and bone mineral density in men.* *J Bone Miner Res*, 2010. **25**(8): p. 1830-8.
59. Vidal, C., M. Brincat, and A. Xuereb Anastasi, *TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta.* *Maturitas*, 2006. **53**(4): p. 386-95.
60. Wynne, F., et al., *Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (FokI), and COL1A1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population.* *Calcif Tissue Int*, 2002. **71**(1): p. 26-35.
61. Zajickova, K., et al., *Is A163G polymorphism in the osteoprotegerin gene associated with heel velocity of sound in postmenopausal women?* *Physiol Res*, 2008. **57 Suppl 1**: p. S153-7.
62. Boyanov, M., *Estimation of lumbar spine bone mineral density by dual-energy X-ray absorptiometry: standard anteroposterior scans vs sub-regional analyses of whole-body scans.* *Br J Radiol*, 2008. **81**(968): p. 637-42.
63. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(3): p. 1215.
64. Jin, H., et al., *Polymorphisms in the 5' flank of COL1A1 gene and osteoporosis: meta-analysis of published studies.* *Osteoporos Int*, 2010.
65. Styrkarsdottir, U., et al., *European bone mineral density loci are also associated with BMD in East-Asian populations.* *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13217.
66. Hsu, Y.H., et al., *An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility Loci for osteoporosis-related traits.* *PLoS Genet*, 2010. **6**(6): p. e1000977.
67. Mencej-Bedrac, S., et al., *The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density.* *J Mol Endocrinol*, 2009. **42**(3): p. 239-47.
68. Lisker, R., et al., *Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers.* *Hum Biol*, 1990. **62**(6): p. 791-801.

XIII. ANEXOS

Anexo 1



Cuestionario de Factores de Riesgo para Osteoporosis.

Nombre _____

Edad: __ __ años Lugar de Residencia _____ Tiempo: __ __ años

Estatura: ____ . ____ m. Peso: ____ . ____ IMC: _____

LUGAR DE NACIMIENTO DE:

Paciente	
Padre	
Madre	
Abuelos Paternos	
Abuelos Maternos	

Antecedentes Familiares de:

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

¿Cuál?	¿Quién?

Antecedentes personales no patológicos

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

Antecedentes personales patológicos

Artritis reumatoide, desnutrición, intolerancia a la leche, Sx de mala absorción intestinal, gastrectomía, hepatopatía crónica, EPOC, mieloma, insuficiencia renal, amiloidosis, epilepsia, cardiopatías, cáncer de _____, osteoporosis, insuficiencia venosa, tromboflebitis, litiasis renoureteral.					
Año dx		Actual	Si	No	
Año dx		Actual	Sí	No	
Año dx		Actual	Sí	No	
Año dx		Actual	Sí	No	

Antecedentes personales patológicos (fármacos)					
Tx con glucocorticoides, heparina, quimioterapia, hormonas tiroideas, análogos de GnRH, anticonvulsivantes, (DFH, fenobarbital, carbamacepina), furosemide, anticonceptivos, tiazidas, tamoxifeno, raloxifeno, difosfonatos, calcitonina, flúor, calcio, calcitriol					
Año dx		Actual	Si	No	
Año dx		Actual	Sí	No	
Año dx		Actual	Sí	No	
Año dx		Actual	Sí	No	

Fracturas (SI (NO) ¿cuántas? _____ localización _____ A qué edad _____

Antecedentes ginecobstétrico						
Edad menarquía : ____ años		Ciclos regulares		Si	No	Duración:
Gesta: ____	Para: ____	Abortos: ____	Cesáreas	Lactancia en meses		
Menopausia	SÍ / No	Edad: ____ años	Histerectomía	Sí	NO	
Ooforectomía	SÍ/ No	Edad: ____ años	Tx de reemplazo hormonal	Sí	NO	

Utiliza o utilizó tratamiento sustitutivo con estrógenos: (Sí) (No)
 Sí la respuesta es sí ¿desde cuándo? _____ ¿Qué tipo de estrógenos? _____ Dosis _____

COMENTARIOS

Aplico: Nombre _____ Fecha _____

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUJERES POSMENOPÁUSICAS

México, D.F., a _____

Por medio de la presente yo, _____

autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado “**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A OSTEOPOROSIS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS DE ORIGEN ÉTNICO MESTIZO-MEXICANO**”

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

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: **completar un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar osteoporosis (como dieta, ingesta de alimentos, medicamentos etc)**, la toma de una muestra única de 4 ml de sangre, así como la realización del estudio que me permitirá saber si tengo o no osteoporosis por medio de un estudio donde medirán mi densitometría ósea con radiografías (estudio llamado DEXA).

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

Riesgos y molestias:

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

Beneficios:

- a) **Las mujeres posmenopáusicas que accedan a participan en el estudio se les llevará a cabo el estudio de la densitometría ósea (método de DEXA), la cual no se les practica rutinariamente.**
- b) **El examen de densidad ósea o DEXA es el método disponible más preciso para el diagnóstico de la osteoporosis, enfermedad que frecuentemente afecta a las mujeres después de la menopausia y también permite estimar el riesgo de fractura en los pacientes, contribuyendo a seleccionar los casos que deben recibir tratamiento médico y de esa forma evitar posibles fracturas.**
- c) **Además se generará información para determinar la asociación entre polimorfismos en genes y el desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, lo que permitirá hacer prevención y dar tratamiento oportuno.**

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Asimismo, se me ha informado que esta muestra además será almacenada a 4°C durante un período de 15 años en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., y a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

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

Asimismo, se me ha informado que de encontrarme osteoporosis, se me ha asegurado que se me informará de la presencia de dicha enfermedad.

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

Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, Laboratorio de Biología del Desarrollo, 2do. Piso del edificio de la Subdirección de Enseñanza e Investigación, San Lorenzo 502, Esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, C.P. 03100, Teléfono: 52002003 ext. 14603 o 14624. correo electrónico: ipcanto@yahoo.com.mx , o con el M en C David Rojano Mejia , Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, Av. Politécnico # 1603, correo electrónico tonallii@yahoo.com.mx

Investigador Responsable
Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
M en C. David Rojano Mejia

Señora

Testigo

Testigo

Se entrega copia de la carta de consentimiento informado a la participante.

Firma y fecha de recibido _____

Risk factors and impact on bone mineral density in postmenopausal Mexican mestizo women

David Rojano-Mejía, MsC,^{1,2} Guadalupe Aguilar-Madrid, PhD,³ Guillermo López-Medina, MD,¹ Leticia Cortes-Espinosa, MD,⁴ Maria C. Hernández-Chiu, MD,⁵ Thelma Canto-Cetina, PhD,⁶ Alma Vergara-López, MD,⁷ Ramon M. Coral-Vázquez, PhD,⁸ and Patricia Canto, MD, MSc, PhD¹

Abstract

Objective: Considering that the Mexican mestizo population seems to be the result of a genetic admixture, we proposed that further research is needed to evaluate the role of ethnicity in conjunction with health-related factors to better understand ethnic differences in bone mineral density (BMD). The aim of this study was to analyze several risk factors related to the development of osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women.

Methods: We included 567 postmenopausal Mexican mestizo women. A structured questionnaire for risk factors was applied and BMD was measured in total hip and lumbar spine by dual-energy x-ray absorptiometry. Non-conditional logistic regression was used to estimate crude and adjusted odds ratio.

Results: Using World Health Organization criteria, 28.7% of postmenopausal women had osteoporosis, 46.4% had osteopenia, and 24.9% had normal BMD. Each clinical risk factor had a different significance for osteopenia/osteoporosis; however, duration of total breast-feeding, body mass index, and number of years since menopause remained significantly associated with osteopenia/osteoporosis after bone density was added to the nonconditional model. Interestingly, extended periods of accumulated breast-feeding for 24 and 36 months were, in both cases, significantly associated with osteopenia/osteoporosis.

Conclusions: Our results confirm the importance of considering the duration of breast-feeding as an important risk factor for osteopenia/osteoporosis. In addition, we find that body mass index is positively associated with BMD. Because of the heterogeneity of the Mexican mestizo population, the risk factor for osteoporosis may not be the same in different ethnic groups.

Key Words: Bone mineral density – Postmenopausal Mexican mestizo women – Total breast-feeding – Body mass index.

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low bone mineral density (BMD) and microarchitectural deterioration of bone leading to increased bone fragility.¹ This syndrome is a major public health problem because of the high risk of fracture, decrease in the quality of life of affected individuals, and high health-care costs.²

Osteoporosis is a silent disease because bone loss occurs without overt symptoms. Individuals are unaware of their condition until they sustain a fracture. Because osteoporosis presents an opportunity for intervention to decrease fracture risk, one of the important challenges in the management of osteoporosis is to identify women who are at high risk for future bone loss and fragility fractures. Risk factors associated

Received June 7, 2010; revised and accepted July 8, 2010.

From the ¹División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México; ²Unidad de Medicina Física y Rehabilitación Región Norte, UMAE Magdalena de las Salinas, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México; ³Unidad de Investigación en Salud del Trabajo, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México; ⁴Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Regional Tacuba, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México; ⁵Unidad de Medicina Familiar No. 20, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México; ⁶Laboratorio de Biología de la Reproducción, Departamento de Salud Reproductiva y Genética, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi," Mérida Yucatán, México; ⁷Servicio de Endocrinología del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México; and ⁸Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, and Divi-

sión de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México.

Funding/support: This work was supported by a grant from the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICDS08-34, México). D. Rojano-Mejía was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and by a fellowship award from the Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social. G. López-Medina was supported by a fellowship award from the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal.

Financial disclosure/conflicts of interest: None reported.

Address correspondence to: Ramón M. Coral-Vázquez, PhD, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, CP 11340, México. E-mail: mcoralv@prodigy.net.mx and Patricia Canto, MD, MSc, PhD, División de Investigación Biomédica C.M.N. 20 de Noviembre, ISSSTE, San Lorenzo No. 502, 2nd piso, Col. del Valle, Delegación Benito Juárez, CP 03100, México, D.F., Mexico. E-mail: ipcanto@yahoo.com.mx

with low BMD include genetics, lifestyle or living conditions, and nutritional and reproductive factors.^{1,3,4} However, the contribution of these risk factors to osteoporosis during menopause remains largely unknown.

The prevalence of osteoporosis varies among Latin American countries. Information regarding the prevalence of osteoporosis in postmenopausal women in Mexico is limited; however, Murrillo-Urbe et al⁵ estimated that the prevalence of osteoporosis in postmenopausal Mexican women older than 50 years is 16% to 20%.

Furthermore, in 2005, Clark et al⁶ reported that the annual rates of hip fracture in two main National Public Health Systems of Mexico were 169 per 10,000 women-year (1/12 women >50 y). Therefore, hip fracture is a large and expanding problem in Mexican women. In addition, the direct medical cost of managing hip fracture in Mexico was approximately US\$97 million for the acute treatment alone.⁷ In addition, increases in life expectancy are reflected in the increase in older women in the Mexican population so that the direct and the indirect costs of fractures are expected to increase in the same way, both in Mexico and worldwide.^{7,8}

Considering that the Mexican mestizo population seems to be the result of the genetic admixture among Amerindians, white individuals, and black individuals, we propose that further research is needed to evaluate the role of ethnicity in conjunction with lifestyle and health-related factors to better understand ethnic differences in BMD and subsequent osteoporosis. On these bases, the aim of this study was to analyze several risk factors related to the development of osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women.

METHODS

Participants

This study was performed as part of a population-based osteoporosis study from the central part of Mexico. All participants were consecutive, unselected postmenopausal women. A total of 756 unrelated postmenopausal women of Mexican mestizo ethnic origin who visited the outpatient clinic for general medical checking between 2009 and 2010 were invited, and 567 women (response rate, 75%) agreed to participate. Ages ranged from 44 to 84 years. Women were considered postmenopausal if they had not menstruated within the 12 months before the examination. Exclusion criteria included having a history of diseases such as inflammatory arthritis, inflammatory bowel disease, chronic asthma, bone metabolism dysfunction, bone metastases, thyroid abnormalities, parathyroid diseases, liver disease, and Cushing syndrome; oophorectomy before 45 years of age; premature menopause before 40 years of age; or use of medications such as corticoids, fluorine, anticonvulsants, or lithium.

Body height and weight were measured at baseline examination with the participant in a standing position without heavy outer clothes and without shoes. Height and weight were used to calculate body mass index (BMI; kilograms per meter squared). A research physician administered a structured questionnaire to all women on a face-to-face basis to define the

potential risk factors for osteoporosis, such as demographic data, medical history, reproductive history (including age at menarche, number of pregnancies, duration of breast-feeding, and age of menopause), consumption of carbonated soft drinks, coffee and alcohol intake, smoking habits, and physical activity. Women were also asked about whether they were currently taking estrogen therapy or calcium supplements.

The study was approved by the institutional human research committee. Informed consent was obtained from all women before participation.

Bone Mineral Density

BMD (in grams per square centimeter) was measured in total hip (trochanter, Ward area, and femoral neck) and lumbar spine (L2-L4) by dual-energy x-ray absorptiometry with a Hologic QDR-1000 (Hologic QDR 4500; Hologic Inc., Waltham, MA). The *t* score was used to analyze BMD data, which is a deviation from BMD weight-adjusted average peak of a race-and sex-matched Latin American healthy population. The stability of the equipment was checked each morning using an anthropometric spine phantom provided by the manufacturer (Hologic). The coefficient of variation of the dual-energy x-ray absorptiometry equipment was 0.6% to 1.0% for L2-L4 and less than 1.5% for the femoral neck.

Statistical analysis

The data of the overall patient population in the study were summarized as means \pm SDs in the case of quantitative variables and as numbers and percentages for qualitative variables.

Bivariate regression analysis was performed separately for BMI, years since menopause, number of pregnancies, number of children, duration of breast-feeding, alcohol consumption, tobacco use, caffeine and cola beverage consumption, calcium supplement, estrogen therapy, and physical activity to identify significant covariates for osteopenia/osteoporosis, and odd ratios (ORs) and 95% CIs are presented. Only BMI, number of years since menopause, and total duration of breast-feeding were significant; thus, they were included in a nonconditional multiple logistic regression, and ORs and 95% CIs are presented. In addition, interactions between all exposure variables were tested, such as number of pregnancies, number of children, estrogen therapy, tobacco use, alcohol intake, caffeine intake, carbonated beverage consumption, and physical activity, and no significant interaction was shown.

Further, we performed analysis of residuals to determine goodness of fit and predictive value using the Hosmer-Lemeshow test.⁹ A *P* value of less than 0.05 was accepted as statistically significant. Statistical analyses were performed using STATA 10.0 SE (STATA Corporation, College Station, TX).

RESULTS

The general characteristics and contribution of single clinical risk factors of the 567 postmenopausal women are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Each clinical risk factor had a different significance for osteopenia/osteoporosis. For example, regarding the women's

TABLE 1. General characteristics of postmenopausal Mexican mestizo women

Variable	Mean (SD) or %
Age, y	59.69 (7.37)
Height, cm	1.52 (0.57)
Weight, kg	67.59 (11.8)
BMI, kg/m ²	29.16 (4.8)
BMD femoral neck, g/cm ²	0.746 (0.116)
BMD total hip, g/cm ²	0.907 (0.130)
BMD lumbar spine, g/cm ²	0.855 (0.141)
Number of pregnancies	4 (2.6)
Number of children	3.5 (2.4)
Duration of breast-feeding, mo	25 (33)
Years since menopause	10.9 (7.8)
Estrogen therapy	15
Tobacco use	15.9
Alcohol intake	0.9
Caffeine intake	64.4
Carbonated beverage consumption	30.5
Physical activity	35.1

BMI, body mass index; BMD, bone mineral density.

BMI classification, a BMI less than 25 kg/m² was associated significantly with osteoporosis (OR, 2.65; 95% CI, 1.46-4.81; *P* = 0.001). Figure 1 displays the diagnosis of osteopenia/osteoporosis based on lumbar spine BMD according to quartiles of BMI. We can observe that most women with a BMI less than 25 kg/m² had osteopenia or osteoporosis in contrast to the women with a BMI greater than 25 kg/m².

Only those women who are less than 10 years since menopause showed a significant association with osteopenia/osteoporosis (OR, 2.27; 95% CI, 1.51-3.41; *P* < 0.0001). Regarding the total duration of breast-feeding, the higher-association women presented a mean duration of breast-feeding of 36 months (OR, 2.48; 95% CI, 1.41-4.38; *P* = 0.002; Table 2).

Duration of total breast-feeding, BMI, and number of years since menopause remained significantly associated with osteopenia/osteoporosis after bone density was added to the nonconditional logistic regression model. According to World Health Organization criteria, 163 (28.7%) women were identified as having osteoporosis, 263 (46.4%) were osteopenic, and 141 (24.9%) had normal BMD. ORs and 95% CIs for the

TABLE 2. ORs of risk factors for osteopenia/osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women (*n* = 567) in a bivariate regression analysis

Risk factors	OR (95% CI)
BMI <25 kg/m ² (vs >25 kg/m ²)	2.65 (1.46-4.81)
>10 y since menopause (vs <10 y)	2.27 (1.51-3.41)
>2 pregnancies (vs <2 pregnancies)	1.475 (0.942-2.311)
>2 children (vs <2 children)	1.511 (1.02-2.23)
Breast-feeding >24 mo	1.96 (1.25-3.08)
Breast-feeding >36 mo	2.48 (1.41-4.38)
Breast-feeding >48 mo	2.14 (1.12-4.09)
Alcohol consumption	0.493 (0.082-2.98)
Tobacco use	0.835 (0.503-1.38)
Caffeine intake	0.803 (0.536-1.20)
Carbonated beverage consumption	0.916 (0.608-1.38)
Not currently using calcium supplement	1.12 (0.691-1.83)
Not taken estrogen therapy	0.970 (0.563-1.673)
Sedentary lifestyle	1.41 (0.955-2.08)

OR, odds ratio; BMI, body mass index.

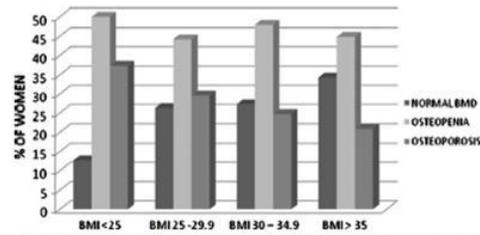


FIG. 1. Percentage of postmenopausal Mexican mestizo women with normal BMD, osteopenia, or osteoporosis in the lumbar spine according to BMI (kg/m²) quartile. BMD, bone mineral density; BMI, body mass index.

final nonconditional logistic regression model with a *t* score of less than -1 to a *t* score of -2.5 SD or less as the dependent variable are shown in Table 3. Interestingly, the extensive periods of accumulated breast-feeding for 24 and 36 months was, in both cases, significantly associated with osteopenia/osteoporosis (*P* = 0.013 and 0.006, respectively).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed the association of clinical risk factors with the presence of osteopenia/osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women. We found a strong association between the total duration of breast-feeding, BMI, and years since menopause.

Among the risk factors for osteoporosis, breast-feeding is one of the most controversial. Pregnancy and breast-feeding are associated with changes in maternal calcium homeostasis, resulting in a decrease in BMD.^{10,11} Throughout pregnancy, ~25 to 30 g of calcium, corresponding to 2% to 3% of the total body calcium of the mother, is transferred to the fetus.¹² In addition, through breast-feeding, the daily loss of calcium in breast milk is likely to range from 250 to 400 mg.^{12,13} Several studies have demonstrated that bone loss associated with breast-feeding is recovered after weaning,^{14,15} although it is unclear whether this bone loss is completely recovered in women with many factors such as maternal age, parity, and duration of breast-feeding.¹⁶

In our population, 81.5% of the women were breast-feeding, and, interestingly, we found an important negative association between BMD and a total duration of breast-feeding of 24 and 36 months. This association was 1.8- and 2.2-fold, respectively. For women with a total duration of breast-feeding of 36 months, the maximum association was 4.07-fold. Furthermore, this trend of negative association

TABLE 3. Crude and adjusted odds ratios of the risk factors for osteopenia/osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women in a nonconditional logistic regression model

Categories	OR _c (95% CI)	OR _a (95% CI)
BMI >25 kg/m ²	2.65 (1.46-4.81)	2.98 (1.63-5.47)
Time since menopause (>10 y)	2.27 (1.51-3.41)	2.05 (1.34-3.13)
Total duration of breast-feeding >36 mo	2.48 (1.41-4.38)	2.24 (1.24-4.02)

OR_c, crude odds ratio; OR_a, adjusted odds ratio; BMI, body mass index.

between total breast-feeding and BMD was maintained with a total duration of breast-feeding of 48 months, although this association was not significant (OR, 1.83; 95% CI, 0.94-3.59; $P = 0.07$). Our results are in accordance with those reported by Dursun et al.¹⁷ wherein the authors analyzed the influence of total duration of breast-feeding on spinal and femoral BMD and subsequent risk of osteoporosis in a Turkish postmenopausal population. A significant association was demonstrated between duration of total breast-feeding and lumbar and femoral neck BMD. However, other studies have found that the total duration of breast-feeding is not associated with reduced age-adjusted BMD in groups of American,¹⁸ Japanese,¹⁹ and Sri Lankan women.²⁰

According to the National Institute of Statistics, Geography, and Informatics of México, our country is the 11th most populous in the world and third in Latin America. On average, Mexican women who live in urban areas have 2.1 children versus three or more children reported by women who live in rural areas.²¹ Furthermore, it is considered that 67.6% of women exclusively breast-feed their children.²² In addition, the Mexican government, through a Norma Oficial Mexicana (NOM-031-SSA2-1999, www.salud.gob.mx/unidades/.../nom/031ssa29.html), encourages women to initiate breast-feeding at the time of birth. On these bases, it is important to remember that breast-feeding confers multiple benefits to both the child and the mother.²³ However, in this study, as in others,^{17,24} we demonstrate that extended-duration breast-feeding may have a negative effect in the postmenopausal period on the mother's bone metabolism. For that reason, we consider that, according to the World Health Organization and the United Nations Children's Fund,^{25,26} the recommendation is that all mothers breast-feed their children for no longer than the first 6 months.

On the other hand, it is well known that obesity and osteoporosis are closely related diseases with a strong genetic component.^{27,28} Previous studies indicated that obesity may accompany increased bone mass and thus protects individuals from osteoporosis.^{29,30} In contrast, other studies have suggested that adiposity may not protect against osteoporosis.^{28,31,32} It has been proposed that higher body weight affects bone mass partly because of the increased peripheral aromatization of estrogens from androgens in the increased adipose tissue.³³ Alternatively, a higher body mass imposes greater mechanical loading on bone, particularly in the cortex; therefore, bone mass increases to accommodate the greater load.³⁴

Premaor et al.³⁵ studied the relationship between BMI and BMD in a cohort of 799 postmenopausal women. These authors found that most women with a BMI greater than

25 kg/m² showed a positive association in relation with BMD. BMI is an independent determinant of BMD in both the lumbar spine and the total hip. This was confirmed in our sample. In the present study, we observed that most women were overweight (42.3%) or obese (38.3%), and, after adjustment for a number of confounding factors, we found a significant negative association in women who had a BMI less than 25 kg/m² than among those with BMI greater than 25 kg/m² in relation to BMD, and this association was more than 3-fold.

Regarding the number of years since menopause, our data were in accordance with the literature,³⁶ establishing a directly proportional relationship between the number of years since menopause and osteoporosis. In our study, this association represented a 1.9-fold difference in women who are more than 10 years since menopause.

In addition, according to previous reports,^{35,37} we observed considerable discordance in the diagnosis of osteoporosis according to the site of measurement. We found that the prevalence of osteopenia and osteoporosis was lower (27.2% and 1.9%, respectively) when only the total hip BMD was considered versus when spine BMD was measured (46.4% and 28.7%, respectively). The latter information is important because of the fact that the spine is preferentially affected by osteoporosis.

Interestingly, we found that BMD in our population is different compared with that of postmenopausal white, Philippine, and Hispanic (Mexican-American) women (Table 4).³⁰ It is noteworthy that total hip BMD in women without osteoporosis was the highest of the four ethnic groups and BMD of the spine was the lowest. The Mexican mestizo population is constituted by a mixture of Europeans and Africans with native Indian individuals.³⁸ These individuals have a proportion of 56% Amerindian genes, 40% white genes, and 4% African genes.³⁹ On these bases and as proposed by Morton et al.,³⁰ these differences in the mean BMD varied as expected for some demographic characteristics. That information may be useful when taking into account that each ethnic group has different phenotypes in their BMD.

This study has several limitations. First, we were unable to determine whether the women interviewed practiced exclusive or predominant breast-feeding. We questioned only the duration of breast-feeding for each child. Second, the requirement for the women to remember past events is also a limitation, and memory bias may have occurred during data collection. Third, the wide age range (44-84 y) is also a limiting factor. Despite these limitations, the strength of this study is that our model clearly showed an increase in the risk of developing

TABLE 4. Comparison of bone mineral density (g/cm²) of four ethnic groups

	White ^a	Philippine ^a	Hispanic ^a	Mexico City ^b
Femoral neck	0.706 (0.682-0.729)	0.710 (0.696-0.723)	0.712 (0.695-0.729)	0.746 (0.460-1.117)
Total hip	0.805 (0.779-0.830)	0.785 (0.770-0.800)	0.822 (0.803-0.840)	0.907 (0.544-1.332)
Lumbar spine	0.939 (0.921-0.957)	0.896 (0.876-0.916)	0.912 (0.887-0.936)	0.855 (0.445-1.343)

^aData from Morton et al.³⁰

^bPresent study.

osteopenia/osteoporosis in women who breast-fed for extended periods (>12 mo). Furthermore, we carried out the analysis of the residuals of the model, applying goodness-of-fit tests and testing the assumptions of the generalized linear models.

CONCLUSIONS

The prevalence of clinical risk factors for osteoporosis may not be the same according to different ethnic groups. Our results confirm the importance of considering the duration of breastfeeding as an important risk factor for osteopenia/osteoporosis. In addition, we find that BMI is positively associated with BMD. Because of the heterogeneity of the Mexican mestizo population, susceptibility to osteoporosis may be different from that of other populations. In addition, it is important to take into consideration that, in our population, BMD of the spine is lower in comparison with total hip BMD. For that reason, diagnosis of osteoporosis in postmenopausal Mexican mestizo women should be carried out by measuring both BMD of the spine and total hip so that the prevalence of osteoporosis in our population will not be underestimated.

Acknowledgments: We thank M. Salas-Rojas (Endocrinology Service of the Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado) for technical assistance.

REFERENCES

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001;285:785-795.
2. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006;367:2010-2018.
3. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1995;332:767-773.
4. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporos Int* 1997;7:390-406.
5. Murrillo-Urbe A, Delezó-Hinojosa M, Aguirre E, et al. Osteoporosis in Mexican postmenopausal women. Magnitude of the problem. Multi-center study. *Ginecol Obstet Mex* 1999;67:227-233.
6. Clark P, Lavielle P, Franco-Marina F, et al. Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population-based study. *Osteoporos Int* 2005;16:2025-2030.
7. Clark P, Carlos F, Barrera C, et al. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos Int* 2008;19:269-276.
8. Johnell O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century. *Am J Med* 1997;103:20S-26S.
9. Hosmer DW Jr, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York, NY: Wiley, 1989.
10. Laskey MA, Prentice A, Shaw J, et al. Breast-milk calcium concentrations during prolonged lactation in British and rural Gambian mothers. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:507-512.
11. Kovacs CS. Calcium and bone metabolism in pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2344-2348.
12. Neville MC, Keller RP, Seacat J, Casey CE, Allen JC, Archer P. Studies on human lactation. Within-feed and between breast variation in selected components of human milk. *Am J Clin Nutr* 1984;40:635-646.
13. Kalkwarf HJ. Hormonal and dietary regulation of changes in bone density during lactation and after weaning in women. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999;4:319-329.
14. Bezerra FF, Mendonça LM, Lobato EC, O'Brien KO, Donangelo CM. Bone mass is recovered from lactation to postweaning in adolescent mothers with low calcium intakes. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1322-1326.
15. Oliveri B, Parisi MS, Zeni S, Mautalen C. Mineral and bone mass changes during pregnancy and lactation. *Nutrition* 2004;20:235-240.
16. Hopkinson JM, Butte NF, Ellis K, Smith EO. Lactation delays postpartum bone mineral accretion and temporarily alters its regional distribution in women. *J Nutr* 2000;130:777-783.
17. Dursun N, Akin S, Dursun E, Sade I, Korkusuz F. Influence of duration of total breast-feeding on bone mineral density in a Turkish population: does the priority of risk factors differ from society to society? *Osteoporos Int* 2006;17:651-655.
18. Melton LJ 3rd, Bryant SC, Wahner HW, et al. Influence of breastfeeding and other reproductive factors on bone mass later in life. *Osteoporos Int* 1993;3:76-83.
19. Kojima N, Douchi T, Kosha S, Nagata Y. Cross-sectional study of the effects of parturition and lactation on bone mineral density later in life. *Maturitas* 2002;41:203-209.
20. Lenora J, Lekamwasam S, Karlsson MK. Effects of multiparity and prolonged breast-feeding on maternal bone mineral density: a community-based cross-sectional study. *BMC Womens Health* 2009;9:19.
21. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Available at: <http://www.inegi.org.mx>. Accessed October 29, 2005.
22. Delgado-Becerra A, Arroyo-Cabrales LM, Diaz-Garcia MA, Quezada-Salazar CA. The impact of rooming-in at the hospital on the prevalence and causes of abandonment of breast-feeding. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006;63:31-39.
23. Ip S, Chung M, Raman G, Trikalinos TA, Lau J. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med* 2009;4:S17-S30.
24. Shilbayeh S. Prevalence of osteoporosis and its reproductive risk factors among Jordanian women: a cross-sectional study. *Osteoporos Int* 2003;14:929-940.
25. WHO. Global strategy for infant and young child feeding. Available at: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562218.pdf>. Accessed April 25, 2005.
26. WHA Resolution 54.2. Available at: <http://www.who.int/wha/resolutions/54.2.html>. Accessed April 25, 2005.
27. Deng FY, Lei SF, Li MX, Jiang C, Dvornyk V, Deng HW. Genetic determination and correlation of body mass index and bone mineral density at the spine and hip in Chinese Han ethnicity. *Osteoporos Int* 2006;17:119-124.
28. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1640-1646.
29. Wardlaw GM. Putting body weight and osteoporosis into perspective. *Am J Clin Nutr* 1996;63:433S-436S.
30. Morton DJ, Barrett-Connor E, Kritiz-Silverstein D, Wingard DL, Schneider DL. Bone mineral density in postmenopausal Caucasian, Filipina, and Hispanic women. *Int J Epidemiol* 2003;32:150-156.
31. Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr* 2006;83:146-154.
32. Núñez NP, Carpenter CL, Perkins SN, et al. Extreme obesity reduces bone mineral density: complementary evidence from mice and women. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:1980-1987.
33. Douchi T, Yamamoto S, Oki T, Maruta K, Kuwahata R, Nagata Y. Relationship between body fat distribution and bone mineral density in premenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 2000;95:722-725.
34. Beck TJ, Oreskovic TL, Stone KL, et al. Structural adaptation to changing skeletal load in the progression toward hip fragility: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2001;16:1108-1119.
35. Premaor MO, Pilbrow L, Tonkin C, Parker RA, Compston J. Obesity and fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2010;25:292-297.
36. Ooms ME, Lips P, Van Lingen A, Valkenburg HA. Determinants of bone mineral density and risk factors for osteoporosis in healthy elderly women. *J Bone Miner Res* 1993;8:669-675.
37. O'Gadaigh D, Debim I, Love S, Richards HK, Compston JE. A prospective study of discordance in diagnosis of osteoporosis using spine and proximal femur bone densitometry. *Osteoporos Int* 2003;14:13-18.
38. Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceno R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
39. Bekker-Mendez C, Yamamoto-Furusho JK, Vargas-Alarcón G, Ize-Ludlow D, Alcocer-Varela J, Gmados J. Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1998;27:373-376.