



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"**

**"EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE VARIANTES GÉNICAS DE  
LOS GENES *VDR*, *ESR1*, *COL1A1*, Y DE ENZIMAS  
METABOLIZADORAS DE LOS FOLATOS SOBRE LA  
DENSIDAD MINERAL ÓSEA Y RIESGO PARA  
OSTEOPOROSIS"**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN:

**GENÉTICA MÉDICA**

ALUMNO

**DR. ADOLFO AGUAYO GÓMEZ**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ**

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL



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.

---

DR. LUIS F. USCANGA DOMÍNGUEZ  
Director de Enseñanza  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

---

DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ  
Jefe del Departamento de Genética  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



# ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
DEFINICIÓN.....	13
DIAGNÓSTICO DE OSTEOPOROSIS.....	15
EPIDEMIOLOGÍA.....	17
ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ÓSEAS.....	21
COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.....	21
MACRO Y MICRO ARQUITECTURA ÓSEAS.....	21
EMBRIOLOGÍA.....	22
METABOLISMO MINERAL EN EL FETO Y NEONATO.....	24
TIPOS DE CÉLULAS ESPECIALIZADAS DEL TEJIDO ÓSEO.....	26
MODELAMIENTO Y REMODELAMIENTO ÓSEOS.....	28
CRECIMIENTO ÓSEO Y MASA ÓSEA PICO.....	30
HORMONAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ÓSEA.....	31
VITAMINA D.....	31
ESTROGENOS.....	38
PATOGENESIS DE LAS FRACTURA.....	49
HEREDABILIDAD DE LA OSTEOPOROSIS-RASGO RELACIONADO.....	51
ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA OSTEOPOROSIS.....	53
HIPÓTESIS.....	64
OBJETIVO.....	64
METODOLOGÍA.....	64
VARIANTES ANALIZADAS.....	65
ANÁLISIS MOLECULAR.....	65
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
RESULTADOS.....	69
DISCUSIÓN.....	71
TABLAS Y FIGURAS.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	81

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Definición de Osteoporosis de acuerdo a los valores de DMO .....	75
Tabla 2 Heredabilidad de osteoporosis y fenotipos relacionados.....	75
Tabla 3 Características de las variantes génicas analizadas .....	76
Tabla 4 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de enzimas del metabolismo de los folatos ( <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> , <i>MTRR</i> , <i>TCN2</i> ), colágena tipo 1 alfa 1 ( <i>COL1A1</i> ), receptor de estrógenos tipo 1 ( <i>ESR1</i> ) y receptor de vitamina D ( <i>VDR</i> ) .....	77
Tabla 5 Resultados de la interacción gen-gen mediante MDR.....	78
Tabla 6 Resultados de la interacción con cuatro variantes génicas mediante el análisis por MDR.....	78
Figura 1 Análisis de interacción mediante MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) con dos variantes génicas “ <i>MTHFR</i> -C677T y <i>VDR</i> -FokI T>C” .....	79
Figura 2 Diferencias en la DMO de cuello femoral. ....	79
Figura 3 Probabilidad de interacción entre dos genes ( <i>MTHFR</i> -C677T y <i>VDR</i> -FokI) y cuatro genes ( <i>MTHFR</i> -C677T, <i>TCN2</i> , <i>VDR</i> -FokI, <i>ESR1</i> -PvuII) de acuerdo a los valores en la DMO. ....	80
Figura 4 Fuerza de interacción de cuatro variantes mediante el análisis de entropía con MDR.....	80

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre Adolfo, mi madre María de la Paz, mis hermanos Gerardo, Mayela y Ana María por ser mi principal inspiración

A mi tutor el Dr. Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz por su dirección, sus invaluable enseñanzas y valiosos consejos

A la QFB. María A. López Hernández porque gracias a su dedicación y experiencia ha sido posible la realización de esta tesis

A la Dra. Nonantzin Alicia Beristain Covarrubias, el Dr. Adrián González Aguirre y la Dra. Melissa Correa Flores, quienes participaron en el reclutamiento de los grupos estudiados y la obtención de las muestras biológicas

A la memoria de mi maestra la Dra. Florencia Vargas Vorácková

Al Dr. Rafael Velázquez Cruz por su orientación en el uso de los programas estadísticos utilizados

A mis compañeros de generación Beatriz, Leslie y Tadeo

A todas las personas del Departamento de Genética del “Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” a quienes guardo un cariño especial en mi corazón

# INTRODUCCIÓN

La Osteoporosis (OPS) es una enfermedad multifactorial, esquelética y sistémica; caracterizada por la disminución de la densidad ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo con un incremento consecuente en la fragilidad y riesgo de fracturas (NAMS 2010). Se considera el trastorno mineral óseo más común en el mundo, afectando a una de tres mujeres, en particular a mujeres postmenopáusicas (MPM), y a uno de ocho hombres mayores de 50 años (Li, 2010). Según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OPS se define de acuerdo a los valores de Densidad Mineral Ósea (DMO) obtenidos por densitometría en la columna lumbar o cadera por debajo de 2.5 desviaciones estándar del promedio para una población de referencia (puntuación T de -2.5 o menor)(Kanis, 2008; NAMS 2010; Ralston y Uitterlinden 2010). Esta medida de la densidad ósea es un rasgo cuantitativo y marcador de OPS y fragilidad ósea (Hosoi 2010).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la OPS es una condición multicausal en la que confluyen e interactúan diferentes mecanismos patogénicos (genéticos, nutricionales, hormonales y ambientales) para la pérdida de la densidad y microarquitectura óseas (Beil, 2008). La homeostasis ósea es mantenida por medio de un proceso fisiológico continuo de remodelación ósea estrechamente regulado en el que participan *osteocitos*, *osteoclastos* y *osteoblastos*. La interrupción de la homeostasis generalmente es resultado de una insuficiente formación de nuevo tejido, un incremento en la resorción, o ambos. Por lo tanto, bajo estas condiciones el tejido óseo carece de un sistema biológico eficaz de reparación y remodelación, que le permitan



detectar y modificar adecuadamente el deterioro en la fuerza y mineralización del hueso (Gogakos, 2009).

Los factores de riesgo asociados con la patogénesis de esta enfermedad son la edad (mayor a 50 años), el género femenino, la postmenopausia, el hipoestrogenismo, el tipo de dieta (escasa en calcio y vitamina D), el tabaquismo, un estilo de vida sedentario, el uso de ciertos medicamentos (glucocorticoides), la presencia de enfermedades coexistentes (Diabetes Mellitus tipo 1, hÍper o hipotiroidismo, enfermedad de Parkinson, artritis reumatoide) y una historia familiar positiva para la enfermedad (Giguere y Rousseau 2000; Kanis, 2008; Li, 2010). Así, por ejemplo las hijas de mujeres con OPS tienen menor DMO comparadas con mujeres control pareadas por edad, además una mujer cuya madre padeció fractura de cadera tiene poco más de dos veces la probabilidad de tener fractura de cadera que mujeres sin historia familiar (RR 2.28 IC95% 1.48-3.51) (Ferrari 2008).

La OPS se caracteriza por tener una alta heredabilidad ( $h^2$ ) de los diferentes componentes del tejido óseo, lo cual refleja la importancia de factores genéticos y antecedentes familiares en el riesgo para OPS (Ferrari 2008). Por ejemplo, estudios de comparación entre gemelos monocigotos y dicigotos reportan una heredabilidad del 60 al 90%; y en progenitores y su descendencia del 45 al 70% (Ferrari 2008; Li, 2010). Lo anterior, sugiere que hasta el 70 o 90% de la variabilidad en la DMO podría ser atribuible a factores genéticos (Giguere y Rousseau 2000). Sin embargo, en el contexto de enfermedades multifactoriales, esta alta heredabilidad no implica que cada

locus posea efectos individuales de gran magnitud, ni tampoco que por sí solos sean suficientes para explicar la enfermedad. Por el contrario, la contribución del componente genético es proporcional a la magnitud e interacción del conjunto de efectos específicos de cada gen y cada variante, fenómeno conocido como epítasis.

Actualmente, se reconocen alrededor de 112 genes como candidatos mayores de susceptibilidad para OPS. Estos pueden ser clasificados en cuatro grupos principales de acuerdo a su relevancia funcional para el metabolismo mineral óseo: *Receptores y hormonas calciotrópicas* (Receptor de vitamina D *VDR*, receptor de estrógenos *ESR1* y *ESR2*, receptor de andrógenos *AR*, receptor de calcitonina *CTR*, entre otros); *factores de crecimiento y citoquinas* (proteínas morfogenéticas de hueso *BMP2* y *BMP7*, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos *FGFR1* y *FGFR2*, interleucinas *IL-6*, *IL-15* e *IL-23*, receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B y su ligando *RANK* y *RANKL*, entre otros); *proteínas de la matriz ósea* (colágena tipo I *COL1A1* y *COL1A2*, osteonectina *SPARC*, integrina alfa 1 *ITGA1*) y *misceláneos* (metilenoetrahidrofolato reductasa *MTHFR*, fosfatasa alcalina *ALPL*, catecol-O-metiltransferasa *COMT* y calmodulina *CALM1*, entre otros)(Xu, 2010). La investigación de éstos y otros genes de susceptibilidad es y ha sido fundamental para tratar de comprender la etiopatogenia de la enfermedad; sin embargo, dado que la contribución de cada una de estas variantes es pequeña, las nuevas líneas de investigación estudian modelos de interacción gen-gen y gen-ambiente para explicar la magnitud, diversidad

e impacto de cada variante génica (individual y en conjunto) asociada con la enfermedad (Giguere y Rousseau 2000).

El primer gen candidato asociado con OPS fue el gen que codifica para el receptor de vitamina D (*VDR*)(Li, 2010). Se postula que ciertas variantes de este gen (*BsmI*, *Apal*, *TaqI*, *FokI* y *Cdx2*) pueden afectar la estabilidad y expresión del RNAm. Esto a su vez modifica la cantidad y calidad de la proteína receptora de la vitamina D, y en consecuencia, el metabolismo del calcio y la DMO. Por ejemplo, la variante *FokI* representa un cambio de C por T en el exón 2 del gen *VDR*, lo cual introduce un nuevo sitio de inicio de traducción que produce una proteína con tres aminoácidos adicionales (C 424 aa, T 427 aa). Mediante estudios funcionales se ha demostrado que la proteína de menor tamaño (424 aa) tiene mejor interacción con el factor de transcripción basal IIB, actividad y respuesta frente a 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. De acuerdo con lo anterior, el genotipo CC podría tener cierto efecto protector para OPS; sin embargo, algunos estudios señalan que este genotipo se encuentra asociado a niveles de DMO significativamente menores en la región distal del radio y a un aumento en el riesgo de fracturas. En este sentido, en población mexicana no se ha observado asociación de *FokI* con OPS, sin embargo el genotipo “bb” de *BsmI* tiene una prevalencia significativamente mayor en mujeres postmenopáusicas con OPS que en controles (Lisker, 2003). En general, estas diferencias en el tipo de variante génica asociada y la magnitud del efecto de susceptibilidad podrían ser explicadas por el tipo de estudio, el tamaño de la muestra, la población estudiada, las interacciones gen-gen y gen-ambiente.

Por otra parte, es importante señalar que la OPS también es parte de grupo menos frecuente de enfermedades monogénicas que afectan la densidad ósea, los procesos de remodelamiento y causan fragilidad ósea. Estas enfermedades han ayudado a la caracterización de genes y vías moleculares implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Algunos ejemplos son la *Osteogénesis imperfecta* causada por mutaciones principalmente en los genes de la colágena *COL1A1* y *COL1A2*, la cual tiene un modo de herencia autosómico dominante en las formas más comunes (tipos I, II, IV y V) y se caracteriza por poseer una densidad ósea disminuida y un marcado incremento en la fragilidad ósea. Otra de éstas enfermedades es el *síndrome Osteoporosis-pseudoglioma* causado por mutaciones en el gen que codifica la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad *LRP5*, el cual tiene un modo de herencia autosómico recesivo y se caracteriza por OPS de inicio en la infancia, microcefalia, microftalmia, pseudoglioma oftálmico, ceguera por hiperplasia del vítreo, opacidad corneal y glaucoma secundario. De la misma manera, los defectos en el gen *CYP19A1* que codifica para la enzima *aromatasa* responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos en tejidos periféricos, y cuya deficiencia tiene un modo de herencia autosómico recesivo y produce distintos grados de virilización en recién nacidas y OPS en varones.

Hasta el día de hoy, la identificación de genes de susceptibilidad ha permitido conocer una porción quizá pequeña de la compleja arquitectura de la osteoporosis. Sin embargo y a pesar de los avances de investigación aún

quedan muchas interrogantes por responder. Es posible que en los próximos años, los nuevos métodos de investigación molecular y estadística, nos permitan conocer a mayor detalle los factores (genéticos y ambientales) que están implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Todo esto nos ayudará a generar mejores predicciones de riesgo para desarrollar la OPS, y al mismo tiempo individualizar el pronóstico, el tratamiento y la prevención de fracturas; y finalmente reducir el gran impacto que esta enfermedad representa para la sociedad (Xu, 2010).

Han sido descritos múltiples enfoques para investigar el conjunto de factores genéticos que participan en el desarrollo de la OPS (Xu, 2010). Actualmente, debido al efecto moderado de variantes genéticas funcionales en la patología compleja del adulto, se han incorporado nuevos métodos de análisis que permiten conocer el efecto de interacción o efecto epistático de dos o más *loci*. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios que relacionen dichas interacciones con la DMO y el riesgo para OPS y fracturas (Gennari, 1998; Uitterlinden, 2001; Vandevyver, 1999; Willing, 1998; Xiong, 2006).

Los pocos estudios de interacción génica en general, la ausencia de los mismos en la población mexicana, la importancia de la patología y los cambios demográficos en la estructura de población, con una mayor expectativa de vida y por ende mayor riesgo de desarrollar osteoporosis y para fracturas, motivó el presente estudio. Es el objetivo del mismo investigar el efecto de la interacción génica entre determinadas combinaciones genotípicas de los genes del receptor de la vitamina D (*VDR*), de la

metilene tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), de la metionina sintasa (*MTR*); de la metionina sintasa reductasa (*MTRR*); del transportador de cobalamina (*TCN2*); del receptor de estrógenos tipo 1 (*ESR1*) y de la colágena tipo 1 alfa 1 (*COL1A1*) sobre los valores de la DMO y riesgo para OPS.

## DEFINICIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define osteoporosis como “una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por disminución de la densidad ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo con un incremento consecuente en la fragilidad y riesgo para fracturas”(NAMS 2010).

Operacionalmente, la OMS ha establecido una definición basada en la Densidad Mineral Ósea (DMO), véase *tabla 1*. La densidad ósea puede ser expresada en gramos de mineral por centímetro cuadrado ( $g/cm^2$ ) o mediante las puntuaciones Z o T. La puntuación Z expresa la comparación de la DMO del paciente con la DMO esperada para su misma edad y género en una población de referencia. En cambio, la puntuación T compara la DMO del paciente con una población de adultos “jóvenes normales” del mismo género. Esta comparación entre la puntuación del paciente y su población de referencia es expresada como desviación estándar por arriba o por debajo de la media. En estos términos, una desviación estándar equivale a 10-15% del valor de DMO en  $gr/cm^2$ .(Kanis, 2008; NAMS 2010; National-Osteoporosis-Foundation 2010)

En mujeres premenopáusicas la puntuación Z es usada para clasificar la DMO por acuerdo internacional. Esta puntuación se basa en la diferencia entre la DMO de la persona y la DMO de la población de referencia del mismo género, edad y etnia. En cambio, en mujeres postmenopáusicas y hombres de 50 años o más, la puntuación T medida en la columna lumbar y cuello femoral, es preferida para clasificar la DMO (normal, osteopenia y OPS) y se

calcula comparando la medición actual con la media de una población de “mujeres jóvenes sanas”. La base de datos de referencia es conformada por mujeres blancas (no ajustadas por grupo poblacional), aunque esto no es aceptado universalmente. Dependiendo del sitio del esqueleto, la disminución fisiológica de la DMO comienza durante la adolescencia, se acelera en mujeres durante la menopausia y progresa en mujeres postmenopáusicas y hombres de 50 años o más (NAMS 2010; National-Osteoporosis-Foundation 2010).

En mujeres premenopáusicas, hombres menores de 50 años y niños, el criterio de clasificación de la OMS no se recomienda. En estos grupos el diagnóstico de OPS no debería recaer sobre un solo criterio. La Sociedad Internacional para la Densitometría Clínica (ISCD por sus siglas en inglés) recomienda que en lugar de la puntuación T debería ser usada la puntuación Z ajustada por raza y grupo étnico, con una puntuación Z de - 2.0 o menor definida como “disminución de la densidad mineral ósea para la edad cronológica” o “por debajo del rango esperado para la edad”.



## DIAGNÓSTICO DE OSTEOPOROSIS

La reducción en la cantidad de hueso mineralizado conduce a la osteoporosis, caracterizada por una disminución en la masa ósea y la densidad mineral ósea. Sin embargo, estos dos parámetros necesitan ser distinguidos. El diagnóstico no invasivo de osteoporosis actualmente se basa en la medición del *contenido mineral óseo* (CMO) y la *densidad mineral ósea* (DMO) mediante técnicas de imagen (Genant, 1996; Peacock, 2002).

La absorciometría de rayos X de energía dual (DXA por sus siglas en inglés) es la técnica disponible más común para evaluar el CMO de la masa ósea en gramos de fosfato de calcio. El CMO está en función del tamaño del esqueleto. En un intento para reducir la varianza entre individuos por el área de hueso escaneado, el CMO es convertido a densidad de área en gramos por  $\text{cm}^2$  (DMO) dividiendo el CMO por el área escaneada proyectada (Peacock, 2002).

La tomografía computada cuantitativa (TCC), es una técnica menos accesible que mide la DMO como una densidad de volumen, en gramos por  $\text{cm}^3$ . Además, la TCC nos muestra la DMO de los compartimentos cortical y trabecular por separado y, si la resolución es suficiente, de la densidad material del tejido óseo.

La densitometría cuantitativa por ultrasonido es otro método de estudio que no mide directamente la DMO sino la velocidad del sonido y la atenuación de

la intensidad del ultrasonido en calcáneo, tibia, rotula y sitios esqueléticos periféricos. La medición del calcáneo por éste medio ha sido validada para predecir fracturas en mujeres postmenopáusicas (cadera y riesgo de fracturas) y en hombres de 65 años y más (fracturas de cadera y no vertebrales) (National-Osteoporosis-Fundation 2010).

Como se ha señalado, en mujeres premenopáusicas la DMO es expresada con propósitos clínicos como puntuación Z en unidades de desviación estándar en relación a una población sana pareada por sexo y edad. Sin embargo, dado que el pico de masa ósea representa el esqueleto en el punto de su máxima fortaleza, la DMO es también expresada en relación al pico de masa ósea como puntuación T para valorar el riesgo de fracturas. La edad en la que se alcanza el pico de masa ósea es tomada algunas veces entre 20 y 30 años pero esto difiere de acuerdo a la máquina DXA y al sitio del esqueleto estudiado (NAMS 2010). Se debe considerar que una puntuación T menor a -2.5 no sólo es un nivel arbitrario para clasificar la DMO, sino que también es sensible al sitio del esqueleto medido y la técnica de medición (Lu, 2001).

## **EPIDEMIOLOGÍA**

La Osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más común en el mundo y afecta a una de cada tres mujeres y uno de cada ocho hombres a los 50 años. El costo de la osteoporosis para los sistemas de salud en el mundo es extremadamente grande. Por ejemplo, en Estados Unidos durante el año 2005 ocurrieron aproximadamente 2 millones de fracturas osteoporóticas lo cual generó un costo directo de 17 mil millones de dólares. Se estima que para el año 2025 los costos de atención tendrán un incremento del 50% (Burge, 2007; Li, 2010).

### **OSTEOPOROSIS EN LA POSTMENOPAUSIA**

La OPS en la postmenopausia es una enfermedad común. En mujeres de 50 años o más el riesgo de sufrir algún tipo de fractura es de 40% (Kanis, 2000). En la postmenopausia, la prevalencia de OPS aumenta conforme incrementa la esperanza de vida para la población. En Europa, se estima que más de 30% de las mujeres de 50 años o mayores tienen OPS definida de acuerdo a los criterios de la OMS, con tasas de incidencia de 14%, 11% y 13% para cadera, columna vertebral y región distal de antebrazo, respectivamente (Cooper 2005).

En México, se estima que una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres de 50 años o más están en riesgo de sufrir una fractura de cadera. En relación a la OPS se reporta una prevalencia del 9% y 17% en hombres y

mujeres respectivamente de 50 años o más para OPS de columna lumbar. Así mismo, una prevalencia de 6% y 16% en hombres y mujeres respectivamente para OPS de cadera (Clark, 2010).

En el año 2005 en nuestro país, se registraron un total de 21,000 casos de fracturas de cadera y se estima que para el año 2050 esta cifra se incremente a 110,055 casos, un 431% más. De las instituciones gubernamentales de salud pública, sólo el 25% cuentan con las herramientas para el diagnóstico de OPS (absorciometría de rayos X energía dual DXA). Además condiciones particulares en nuestro país hace evidente que si bien el tratamiento está disponible a la población y fue aprobado por la Secretaría de Salud, el Sistema de Salud no lo cubre por completo.

Los estudios sobre prevalencia de OPS y osteopenia de acuerdo a la clasificación de la OMS son recientes en México (Clark, 2010; Clark, 2009; Deleze, 2000). Uno de estos estudios se realizó en tres diferentes áreas geográficas de México. Delezé y cols.(Deleze, 2000) evaluaron la DMO en cuello femoral y columna lumbar de 4,460 mujeres entre 20 y 90 años de edad de 10 diferentes áreas urbanas del país (5 del norte, 4 del centro y 1 del sureste). Los resultados mostraron diferencias significativas en el promedio de DMO entre las diferentes regiones del país. Por ejemplo, en la columna lumbar las mujeres del norte del país tuvieron en promedio mayores niveles de DMO ( $1.089 \pm 0.18 \text{ g/cm}^2$ ) que las del centro ( $1.065 \pm 0.17 \text{ g/cm}^2$ ) y sureste ( $1.013 \pm 0.19 \text{ g/cm}^2$ ). De forma similar, en el cuello femoral las

mujeres del norte del país también reportaron mayores niveles de DMO ( $0.895 \pm 0.14 \text{ g/cm}^2$ ) que aquellas del centro ( $0.864 \pm 0.14 \text{ g/cm}^2$ ) y sureste ( $0.844 \pm 0.14 \text{ g/cm}^2$ ). Ajustadas por peso se mantenían estas diferencias, por lo que los autores argumentan que quizá estas diferencias están relacionadas con un mayor promedio en la talla y un mejor estado nutricional de las mujeres del norte del país.

El segundo estudio realizado en nuestro país analizó una muestra aleatoria de mujeres y hombres de 50 años y más que fue parte del Estudio Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral "LAVOS". La OPS se diagnosticó en columna lumbar en 17% de las mujeres y 9% de los hombres; y osteopenia en el 43% de las mujeres y en el 30% de los hombres en la columna lumbar. En la región del fémur, la OPS se detectó en 16% de las mujeres y 6% de los hombres; y osteopenia en el 41% de las mujeres y 56% de los hombres (Clark, 2009) .

La tasa de incidencia y el riesgo a lo largo de la vida de fracturas de cadera en mujeres y hombres de 50 años fueron publicadas en 2005 (Clark, 2005). En este estudio, los casos de fractura de cadera registrados en 2000 en todos los hospitales de tercer nivel de los dos principales sistemas de salud de la Ciudad de México, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Secretaría de Salud (SS). Se estima que anualmente 169 mujeres y 98 hombres por 100,000 personas tienen fracturas de cadera. La tasa total en mujeres es el doble de la de los hombres; estas diferencias son mayores a

los 70 años y más.

El número de fracturas de cadera se incrementa con la edad en ambos sexos. El riesgo a lo largo de la vida de tener una fractura de cadera es de 3.8% y 8.5% para hombres y mujeres respectivamente. En otras palabras, 1/20 hombres y 1/12 mujeres sufrirán una fractura de cadera a lo largo de la vida. Si se estandariza la incidencia con la de Estados Unidos, la tasa de incidencia de fracturas de cadera ajustadas por edad es de 108 y 203 por 100,000 hombres y mujeres respectivamente. De acuerdo a la clasificación hecha por Maggi y cols (Maggi, 1991), México tienen una tasa intermedia de fracturas comparada con otros países, la tasa más alta es para Suecia y caucásicos de Estados Unidos de Norteamérica; y la más baja es para China y Turquía.

El estudio LAVOS reportó la prevalencia radiográfica de fracturas vertebrales en mujeres de 50 años y mayores de cinco países latinoamericanos. La prevalencia total en mujeres mexicanas fue de 19.2% la cual es la más alta entre los 5 países incluidos en el estudio (Argentina, Brasil, Colombia, México y Puerto Rico). La prevalencia de fracturas en las mujeres mexicanas fue similar y consistente con la del estudio SOF en Estados Unidos de Norteamérica y el estudio Beijing en China (Clark, 2009).

## **ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA ÓSEAS**

El esqueleto proporciona una estructura rígida al organismo, protege órganos vitales, actúa como un sitio de adherencia para los músculos, y protege a la médula ósea. Contiene 99% del total del calcio corporal y regula la homeostasis de calcio y fosfato.

### **COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO**

El contenido mineral óseo representa el 65% del peso seco total de un individuo. La matriz mineral contiene al depósito mineral del organismo, principalmente de hidroxapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y otros elementos como carbonato, citrato, magnesio, sodio, fluoruro y estroncio. La matriz orgánica representa el 35% del peso seco total del individuo y se compone de colágena tipo 1 (90%), proteoglicanos, y un número de proteínas no colágenas, entre las que se incluyen osteopontina, osteocalcina, trombospondina, fibronectina, y sialoproteínas óseas. También contiene factores de crecimiento, incluyendo factores de crecimiento de tipo insulina (IGFs), factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs) y varias proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) (Fleisch 1997; Kanis 1994a; Marcus, 1996).

### **MACRO Y MICRO ARQUITECTURA ÓSEAS**

A nivel macroscópico hay dos tipos de hueso: cortical (compacto) y trabecular (poroso o esponjoso). El *hueso cortical* comprende aproximadamente el 80%

de la masa mineral ósea de todo el esqueleto. Se encuentra en las diáfisis de los huesos largos y en la superficie exterior de los huesos planos. Está formado por hueso compacto ordenado en capas concéntricas alrededor de un canal central (sistema Haversian) que contiene vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y tejido conectivo. El *hueso trabecular* representa aproximadamente el 80% de las superficies óseas en remodelamiento. Se encuentra principalmente en los extremos terminales de los huesos largos (metáfisis y epífisis) y en el interior de los huesos planos y las vértebras. Se compone de láminas interconectadas entre las que se encuentra la médula ósea (Ferrari y Ringe 2009).

La fuerza mecánica del hueso cortical se incrementa con su diámetro (o el área transversal) y su espesor, disminuye con la porosidad cortical (como se observa durante el envejecimiento), mientras que la fuerza del hueso trabecular es principalmente determinada por el número y grosor de la trabécula y sus conexiones horizontales (Seeman 2002). El hueso trabecular es rápidamente remodelado y por lo tanto es afectado por múltiples condiciones asociadas con el incremento en el metabolismo del hueso cortical, como se ha visto en la fase temprana de la menopausia las mujeres (Ferrari y Ringe 2009).

## **EMBRIOLOGÍA**

El desarrollo temprano del esqueleto en el embrión depende de múltiples vías de señalización, entre las cuales se incluyen los genes *Hox*, *Wnt*,



*Hedgehogs*, proteínas morfogenéticas del hueso, factores de crecimiento de fibroblastos, Notch/Delta, y otros factores (Yang 2009). Al final de la 4ª semana de desarrollo embrionario las células del mesénquima, derivadas del mesodermo y ubicadas en determinados patrones espacio-temporales dan origen al esqueleto axial y apendicular. Estas células del mesénquima se convertirán directamente en osteoblastos en los sitios de formación ósea intramembranosa proceso denominado *osificación intramembranosa* (ej. Bóveda craneal), mientras que en el resto del esqueleto en desarrollo éstas células se transformarán en condroblastos para iniciar la formación del hueso endocondral, proceso denominado *osificación endocondral* (Kovacs 2011).

Al final de la 8ª semana de gestación se desarrolla una estructura cartilaginosa con dígito y articulaciones. La estructura cartilaginosa de cada hueso largo se extiende hacia cada extremo, con lo cual las células más antiguas son ubicadas cerca del centro en proceso de diferenciación, hipertrofia y apoptosis. Los condroclastos y osteoclastos reabsorben a los condrocitos en apoptosis y rodean a la matriz, ocurre entonces la invasión vascular, y los osteoblastos se colocan en la esponjosa primaria (osteoides) que será mineralizada. Estos centros de osificación primaria se forman en las vértebras y en los huesos largos entre la 8ª y 12ª semanas, pero la mineralización de la mayor parte del esqueleto ocurre hasta el tercer trimestre de la gestación. La reabsorción y el remodelamiento de la esponjosa primaria para crear la esponjosa secundaria ocurren en el útero, proceso que puede incrementar de forma anormal cuando el feto es afectado por hipocalcemia materna. En la semana 34 de gestación, los centros de osificación secundaria

aparecen en el fémur (creando verdaderas placas de crecimiento), pero por otro lado la mayoría de las epífisis son cartilaginosas hasta después del nacimiento (Moore y Persaud 1998). Las placas de crecimiento se fusionan durante la pubertad, después de lo cual el crecimiento lineal no es posible (Kovacs 2011).

## **METABOLISMO MINERAL EN EL FETO Y NEONATO**

Durante el desarrollo humano, los valores de calcio séricos, calcio ionizado, magnesio y fósforo aumentan por encima de los valores maternos (Kovacs, 2001b; McDonald, 2004; Simmonds, 2010). Algunos estudios en fetos de ratón sugieren que estas altas concentraciones son necesarias para la agregación normal de minerales pero no para la sobrevivencia al nacimiento (Kovacs, 2001a; Kovacs, 1996; Kovacs, 2001b).

Los humanos y otros mamíferos durante el período fetal presentan bajos niveles de hormona paratiroides, 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) y factor de crecimiento de fibroblastos 23; y altos niveles de proteína relacionada con hormona paratiroides (PTHrP) y calcitonina (Takaiwa, 2010). La 25-hidroxitamina D cruza fácilmente la placenta lo cual produce niveles en el cordón umbilical entre el 75% y 100% del valor materno al nacimiento (Haddad, 1971; Seki, 1994; Viljakainen, 2010). Los bajos niveles de calcitriol son resultado de la supresión de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27b1) por la elevación del calcio y fósforo séricos, y la disminución de la hormona paratiroides. Pero

si se presenta hiperparatiroidismo fetal entonces los niveles de calcitriol fetal se incrementan marcadamente (Kovacs, 1998).

Estudios en animales han demostrado que la ausencia de paratiroides, hormona paratiroides o PTHrP pueden causar hipocalcemia e hiperfosfatemia fetal (Kovacs, 2001a; Kovacs, 1996; Kovacs, 2001b; Simmonds, 2010), mientras que la ausencia de calcitonina (McDonald, 2004), vitamina D (Brommage y DeLuca 1984; Halloran y De Luca 1981; Miller, 1983), calcitriol (Lachenmaier-Currle y Harmeyer 1989), o receptor de vitamina D (Kovacs, 2005) no afecta el calcio o fosforo en la sangre fetal.

Los minerales ingresan al feto principalmente a través de la placenta, mientras que los riñones e intestinos permiten al calcio ser llevado al líquido amniótico y entonces ser ingerido y reabsorbido. PTHrP regula el calcio placentario y posiblemente la transferencia de magnesio, aunque la hormona paratiroides (PTH) puede también tener alguna participación (Barri, 1990; Care, 1990; Husain, 1994; Kovacs, 1996; Simmonds, 2010). Durante el transporte activo de calcio la placenta sobre regula la expresión de genes involucrados en el transporte de calcio y el mineral se agrega rápidamente en el esqueleto fetal (Bruns, 1978; Delorme, 1982; Glazier, 1992; Kovacs, 2005). El esqueleto humano agrega el 80% del calcio requerido en el tercer trimestre (Trotter y Hixon 1974).

Al nacimiento los niveles de calcio total y calcio ionizado disminuyen en ausencia del aporte placentario de calcio y hormonas calciotrópicas; y de la

elevación del pH inducido por la respiración (Loughead, 1988). El fosforo se incrementa en el mismo intervalo y posteriormente disminuye. La PTH se incrementa a casi valores de un adulto normal en 24 o 48 horas después del nacimiento y esto precede al incremento de calcitriol.

El neonato es dependiente de la absorción intestinal para lograr el aporte de minerales. La absorción de calcio en recién nacidos es principalmente pasiva y no saturable (Barltrop y Oppe 1973; Giles, 1987). El alto contenido de lactosa en la leche materna incrementa la difusión paracelular de calcio en la región distal del intestino delgado y la biodisponibilidad neta de calcio en la dieta (Kobayashi, 1975; Kocian, 1973). Conforme el neonato madura, la absorción pasiva de calcio disminuye, los enterocitos sobre regulan la expresión del receptor de vitamina D y genes transportadores de calcio y por lo tanto, la absorción de calcio se convierte en un proceso activo y dependiente de vitamina D (Giles, 1987; Senterre y Salle 1982; Shaw 1976).

## **TIPOS DE CÉLULAS ESPECIALIZADAS DEL TEJIDO ÓSEO**

Hay 3 tipos de células especializadas en el sistema óseo, osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Los osteoclastos son células derivadas del sistema hematopoyético del linaje monocito/macrófago. El osteoclasto diferenciado es una célula multinucleada (4-20 núcleos) con una membrana orientada hacia la superficie del hueso la cual secreta ácidos y enzimas (como metaloproteasas de matriz y catepsina K) necesarias para la disolución/digestión de la matriz ósea (Rodan y Duong 2008). Los osteoblastos son derivados de células madre mesenquimatosas

pluripotenciales (MSCs) y su función principal es la síntesis de hueso matriz ósea y su mineralización posterior. Para el proceso de mineralización se requieren 2 factores, colágena tipo 1 y fosfatasa alcalina (ALP), los cuales son también marcadores de la actividad de los osteoblastos (Murshed, 2005). Los osteocitos son células diferenciadas de los osteoblastos que son integrados en la matriz ósea mineralizada. Se desconoce si los osteocitos pueden tener la capacidad para sintetizar una matriz ósea mineralizada, sin embargo estas constituyen el 90% de las células en el esqueleto del adulto. Los osteocitos actúan como mecanosensores, lo que les permite identificar tensión física y microdaño; e iniciar el apropiado proceso de modelamiento o remodelamiento (Bonewald y Johnson 2008).

La *resorción ósea* es el proceso por el cual los osteoclastos reabsorben el tejido óseo de forma fisiológica. La pérdida de tejido resultante es compensada por la formación de nuevo tejido por los osteoblastos. Esta función es regulada estrechamente por la vía de señalización del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) central en la diferenciación y función de osteoclastos. El receptor RANK es expresado en células de linaje osteoclasto y es activado por su ligando (RANKL), el cual activa a las células hematopoyéticas precursoras de los osteoclastos por sobreexpresión del factor nuclear  $\kappa$ B y otras vías de señalización intracelular. Este proceso es bloqueado por osteoprotegerina (Verhagen, 1998), un receptor soluble que se une a RANKL inhibiendo la vía de señalización RANKL/RANK (Beil, 2008).

El proceso de *formación de nuevo tejido óseo* es llevado a cabo por los osteoblastos. Este proceso es regulado por PTH, TGF $\beta$ , proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y la vía de señalización *Wnt*. Los miembros de la familia de proteínas *Wnt* se unen y activan a la proteína 5 receptor-relacionada de lipoproteína (LRP5) para regular la formación de hueso, la resorción ósea y la masa ósea (Glass, 2005; Johnson, 2004). Hay al menos 19 miembros de la familia *Wnt* y aún se investiga cual es el más importante en la regulación del metabolismo óseo, pero reciente evidencia sugiere que *Wnt7b* y *Wnt10b* están ambos involucrados (Beil, 2008; Krishnan, 2006).

Una variedad de inhibidores de la vía de señalización LRP5 han sido también identificados, incluyendo proteínas solubles Frizzled-relacionadas (sFRP), Dick-kopf1 (*Dkk1*), y esclerostina (*SOST*), y es probable que la regulación de la formación de hueso dependa del balance entre los niveles de moléculas estimuladoras *Wnt* y niveles de inhibidores como sFRP y *SOST*. Esclerostina es de particular interés por que es producida por osteocitos en respuesta a la carga mecánica y probablemente juega un papel clave en la mecano-transducción de señales (Robling, 2008). En investigaciones recientes ha resaltado el hecho de que vías neuronales tienen un papel en la regulación del remodelamiento óseo. Estas incluyen el sistema nervioso simpático a través de la producción de catecolaminas (Takeda, 2002), óxido nítrico (van't Hof, 2004) y el sistema endocannabinoides (Idris, 2009; Idris, 2005; Ofek, 2006).

## **MODELAMIENTO Y REMODELAMIENTO ÓSEOS**

El modelamiento óseo es el proceso de adaptación del hueso en relación a su tamaño y forma durante el desarrollo. Este proceso incrementa la mineralización hasta que se alcanza la masa ósea pico en el esqueleto del adulto. El modelamiento óseo es consecuencia de la formación y resorción del hueso en desarrollo. Durante el crecimiento ocurre una intensa actividad de formación ósea sobre las superficies externas del hueso (periostio) *de novo* y sin previa resorción ósea; mientras que la aposición del endostio es predominante en mujeres durante la pubertad (Rauch, 2006). Durante la vida adulta y el envejecimiento persiste una baja actividad de modelamiento óseo, mayor en hombres que en mujeres, lo que explica el incremento en el diámetro del hueso cortical visto por ejemplo en el cuello femoral (Ferrari y Ringe 2009).

El remodelamiento óseo es el proceso de remoción de hueso llevado a cabo por osteoclastos, seguido por el depósito de nuevo tejido realizado por osteoblastos. Los osteoblastos producen una matriz ósea no calcificada (osteóide), que posteriormente comienza a mineralizarse. Ocurre a lo largo de la vida en las superficies trabeculares y endocorticales, para asegurar la adaptación del esqueleto a las necesidades funcionales, reparar microdaños y mantener la homeostasis de calcio sérico. En circunstancias normales, la resorción es seguida por la formación y las cantidades de hueso resorbido y formado deben estar en equilibrio cuantitativamente (balance). Cada ciclo de remodelamiento toma entre 4 y 6 meses en ser completado, la mayoría de este tiempo es ocupado por la formación de nuevo tejido. Aproximadamente 5-10% del esqueleto es renovado por remodelamiento cada año (el esqueleto

es renovado completamente cada 10 años) (Ferrari y Ringe 2009; Seeman y Delmas 2006). Además, el remodelamiento total del hueso ocurre “aleatoriamente” sobre todas las superficies óseas, un blanco de remodelamiento ocurre para eliminar microdaños (ej. Microfracturas) el cual puede ser iniciado por los osteocitos (Parfitt 1992).

### **CRECIMIENTO ÓSEO Y MASA ÓSEA PICO**

La “masa ósea pico” se refiere a la cantidad de tejido óseo presente al término de la maduración esquelética. La cantidad y calidad del tejido óseo de un individuo refleja la experiencia desde la vida intrauterina a través de los años de crecimiento hasta alcanzar la etapa adulta. El esqueleto crece en proporción al crecimiento corporal, en talla, extensión, masa y densidad volumétrica. Para hombres y mujeres con peso normal la masa ósea pico se alcanza pocos años antes de la fusión de las epífisis de los hueso largos. Durante la niñez y adolescencia la masa ósea se incrementa hasta alcanzar un punto máximo al final de la segunda década de la vida. En las mujeres, la masa ósea pico se alcanza entre los 12 y 13 años de edad y declina rápidamente después del comienzo de la menstruación. En los hombres este pico ocurre entre los 13 y 14 años de edad y puede continuar por al menos uno o más años que en las mujeres. La edad a la que se alcanza este pico también difiere entre grupos étnicos, siendo mayor en individuos de raza negra, sin embargo se cree que estas diferencias pueden ser explicadas por el tamaño corporal. Los estrógenos son esenciales para el cierre normal de las placas de crecimiento en ambos sexos. Las mujeres con menarca retrasada son más altas pero tienen menor masa ósea y corticales más



delgadas. Por lo tanto, las hormonas esteroideas tienen una participación importante para la obtención de la masa ósea pico y son responsables del dimorfismo sexual del esqueleto, el esqueleto masculino se caracteriza por mayor tamaño, mayor diámetro y una cortical más gruesa en los hueso largos. Sin embargo, la densidad mineral ósea del pico de masa ósea es similar para hombres y mujeres adultos jóvenes. La masa ósea pico es determinada por un número de factores entre los que se incluyen: genéticos, actividad física, factores endocrinos, ingesta de calcio y otros aspectos nutricionales más generales y exposición a factores de riesgo. Estudios epidemiológicos indican que el incremento del 10% en el pico de masa ósea en mujeres caucásicas podría retrasar 5-10 años el desarrollo de osteoporosis en la postmenopausia y disminuir 30% el riesgo de fractura de cadera (Kanis 1994b).

## **HORMONAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ÓSEA**

### **VITAMINA D**

La vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) puede tomarse de la dieta o ser sintetizada en la piel de 7 dehidrocolesterol por irradiación ultravioleta. La vitamina D producida por 7 dehidrocolesterol depende de la intensidad de la irradiación UV, la cual cambia con la estación y latitud (Webb, 1988). La vitamina D debe ser convertida a su forma activa para ser biológicamente activa, afectar el metabolismo mineral y tener efecto sobre numerosas y diversas funciones fisiológicas, como inhibición de crecimiento de células cancerosas y protección contra ciertas enfermedades mediadas inmunológicamente (Omdahl, 2002; Prosser y Jones 2004).

La vitamina D es transportada en la sangre por la proteína de unión a vitamina D (DBP, una proteína de unión específica para vitamina D y sus metabolitos en suero) hacia el hígado. En el hígado se hidroxila en C-25 por una o más 25-hidroxilasas de vitamina D citocromo P450 (CYP2R1, CYP2D11, y CYP2D25) lo que da por resultado la formación de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>). Se ha sugerido que CYP2R1 es la enzima clave requerida para la 25-hidroxilación de vitamina D, dado que una mutación en estado homocigoto del gen CYP2R1 fue encontrada en un paciente con bajos niveles circulantes de 25(OH)D<sub>3</sub> y síntomas clásicos de deficiencia de vitamina D (Cheng, 2004). 25(OH)D<sub>3</sub> es transportada por la DBP a los riñones. En el riñón, la magalina, un miembro de la superfamilia de receptores de lipoproteínas de baja densidad, tiene un papel esencial en la internalización de 25(OH)D<sub>3</sub> (Nykjaer, 1999). En el túbulo renal proximal la 25(OH)D<sub>3</sub> es hidroxilada en la posición del carbono 1 en el anillo A, resultando en la forma hormonalmente activa de la vitamina D, la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

La mono-oxigenasa citocromo P450 25(OH)D 1 α hidroxilasa (CYP27B1; 1α(OH)asa), la cual metaboliza 25(OH)D<sub>3</sub> a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> está presente predominantemente en el riñón. Esta enzima es también encontrada en sitios extrarrenales como placenta, monocitos y macrófagos. Mutaciones que inactivan el gen de 1α(OH)asa ocasionan *raquitismo dependiente de vitamina D* (VDDR) tipo 1 a pesar de la ingesta normal de vitamina D, indicando la importancia de la enzima 1α(OH)asa (Kitanaka, 1998). El VDDR tipo 1 es

caracterizado por problemas de crecimiento, hipocalcemia, elevación de PTH, debilidad muscular y hallazgos radiológicos típicos de raquitismo. El ratón con una mutación nula para  $1\alpha(\text{OH})\text{asa}$  ha dado el modelo de ratón de VDDR tipo 1. Es interesante que en estos ratones, además de raquitismo, presentan defectos reproductivos e inmunológicos. Mayores estudios son necesarios para evaluar el papel de  $1\alpha(\text{OH})\text{asa}$  en sitios extrarrenales, los cuales han sido materia de debate (Christakos, 2010).

El receptor de vitamina D (VDR) es la proteína intracelular efectora de los cambios específicos en la expresión de genes que ocurren como resultado de la presencia de la vitamina D. La unión de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a VDR promueve el contacto a regiones reguladoras de genes blanco e inicia la formación de grandes complejos de proteínas cofactores que producen diversos cambios en la transcripción de genes (Sutton y MacDonald). En la mayoría de las células blanco esta función dispara la expresión de distintas vías de señalización que se combinan en una misma respuesta biológica específica. Estas respuestas son tejido específico y mantienen el control homeostático del metabolismo mineral para el crecimiento, diferenciación y numerosas actividades funcionales de distintos tipos de células (sistema inmune, piel, páncreas y hueso) Bouillon, (2008).

El VDR comprende 3 regiones diferentes, un dominio N-terminal dual de tipo dedos de zinc de unión a DNA, un dominio C-terminal de unión a ligando y una región extensa no estructurada que enlaza los dos dominios funcionales juntos. La unión de VDR a su ligando produce la formación de dos superficies

de interacción entre proteínas, una que facilita la interacción con un compañero heterodimérico requerido para la unión específica al DNA y otra requerida para la modulación de genes. Estudios adicionales sugieren que el VDR puede ser modificado post-transcripcionalmente mediante fosforilación (Pike y Meyer 2010).

Aunque se han identificado genes blanco importantes para la homeostasis de calcio y fosforo, todavía quedan otros genes blanco que no han sido descubiertos. Entre los genes blanco podemos mencionar los genes de los transportadores de calcio y fosfato, las bombas de protones en intestino y riñón; y los factores de diferenciación de osteoblastos-osteoclasto como RANKL, el cual estimula la resorción ósea, prolonga su vida media e induce la formación de nuevo tejido. Los genes y vías de señalización identificados como responsables de la acción de la vitamina D son complejos. Además mucho del conocimiento al respecto ha surgido como consecuencia de las nuevas tecnologías de secuenciación de genoma completo (Pike y Meyer 2010).

### **PROTEÍNA DE UNIÓN A VITAMINA D (DBP)**

Estudios en ratón deficiente en DBP han puesto al descubierto el papel de DBP en el metabolismo y acción de vitamina D. Aunque el ratón nulo DBP tienen niveles de 25(OH)D y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> marcadamente bajos comparado con el ratón normal, los niveles de calcio sérico y PTH son normales (Safadi, 1999) . En pacientes con niveles reducidos de DBP circulante, los niveles de calcio sérico también han sido reportados como normales(Bikle, 1985). Estudios recientes usando ratones nulos para DBP han mostrado que DBP

es importante para la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  total circulante pero no influye en la parte de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  que entra en las células y afecta la síntesis de proteínas blanco de vitamina D (Zella, 2008). Además, la medición directa de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no refleja la fracción biológicamente activa. Esto puede ser, en parte por que  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , la cual es también más estable que  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , es usada para valorar el estado clínico de vitamina D. Se ha sugerido que el mantenimiento de los niveles de calcio sérico normales en el ratón nulo para DBP pueden ser resultado de la habilidad del receptor de vitamina D para concentrar  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en los tejidos debido a su alta afinidad por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , produciendo la regulación transcripcional de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del calcio (Christakos, 2010).

#### **24-HIDROXILASA (24(OH)ASA)**

Además de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , el riñón también produce 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> ( $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), un metabolito relativamente inactivo comparado con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La 25-Hidroxitamina D<sub>3</sub> 24-hidroxilasa (CYP24), también una enzima P450 mitocondrial, puede hidroxilar tanto a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  como a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Omdahl, 2002). Se ha sugerido que el sustrato preferido para 24(OH)asa es  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Además, 24(OH)asa limita la cantidad de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células blanco mediante el incremento del catabolismo de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ , lo que da por resultado ácido calcitrico, o produciendo  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , por tanto disminuyendo la fracción de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  disponible para 1-hidroxilación. Estudios usando ratón mutante nulo 24(OH)asa nos dan la primera evidencia de un papel para 24(OH)asa en el

catabolismo de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Este ratón es incapaz de eliminar  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  del torrente sanguíneo después del tratamiento agudo o crónico con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . (St-Arnaud, 2000) La escasa  $24(\text{OH})$  produce un defecto en la mineralización en hueso intramembranoso. Este defecto fue normalizado mediante el cruce de un ratón deficiente de  $24(\text{OH})$ asa con un ratón mutado para el receptor de vitamina D, indicando que niveles elevados de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , fueron responsables de las anomalías en el hueso. Además, la principal función de  $24(\text{OH})$ asa es la inactivación de la vitamina D (Christakos, 2010).

### **REGULACIÓN DE HIDROXILASAS DE VITAMINA D POR CALCIO, FOSFATO, PTH Y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$**

Los diversos efectos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  necesitan una estrecha regulación de su biodisponibilidad y un proceso de activación y desactivación que ocurre a través de una serie de circuitos de retroalimentación negativa y positiva, esto causa cambios en la expresión de las hidroxilasas dependiendo del estado fisiológico (Henry y Norman 1984). En relación a la regulación del metabolismo de vitamina D, la dieta baja en calcio y fósforo produce un incremento en la actividad de  $1\alpha(\text{OH})$ asa. La elevación de PTH resultado de hipocalcemia es una señal primaria que interviene en la inducción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el riñón. La PTH estimula la transcripción de  $1\alpha(\text{OH})$ asa. Recientes estudios han mostrado que el receptor nuclear  $4A2$  (NR4A2) es el factor clave involucrado en la inducción de transcripción de  $1\alpha(\text{OH})$ asa por la PTH (Zierold, 2007). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en cambio suprime la producción de PTH al nivel de transcripción. Cuando se comparó con la regulación de

$1\alpha(\text{OH})\text{asa}$ ,  $24(\text{OH})\text{asa}$  es recíprocamente regulada (estimulada por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e inhibida por bajos niveles de calcio y PTH). La marcada inducción de  $24(\text{OH})\text{asa}$  por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ocasiona una supresión autorregulatoria de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  cuando el efecto transcripcional de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  necesita ser atenuado para proteger contra hipercalcemia. Han sido identificados varios factores que cooperan con el VDR en la regulación transcripcional de  $24(\text{OH})\text{asa}$ , como el factor de transcripción C/EBP $\beta$ , SWI/SNF (complejos que remodelan la cromatina usando la energía de la hidrólisis de ATP) y las metiltransferasas de histona (CARM1 y G9) (Christakos, 2006; Dhawan, 2005). Recientes estudios han sugerido que una sinergia entre histonas acetiladas y metiladas puede desorganizar la unión DNA/histona, lo que da por resultado un incremento en la activación de VDR por transcripción de  $24(\text{OH})\text{asa}$  (Christakos, 2010).

### **FGF23**

Además del calcio, fósforo, PTH, y  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), un factor fosfatúrico que promueve la excreción renal de fósforo mediante un decremento en su reabsorción en el túbulo proximal, es también un regulador fisiológico del metabolismo de la vitamina D. A diferencia de las funciones clásicas de FGFs que actúan por mecanismos paracrinos, FGF23 pertenece a la subfamilia FGF19 que actúa en forma endocrina. Desde su identificación como factor causante de *raquitismo hipofosfatemico autosómico dominante*, *raquitismo hipofosfatemico ligado al X* y *osteomalacia tumor-inducida*, FGF23 ha demostrado ser un importante regulador de la homeostasis y síntesis de

vitamina D(Shimada, 2001; The ADHR Consortium 2000; Weber, 2003; White, 2001). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  estimula la producción de FGF23 en el hueso. La administración de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  al ratón produce un incremento en los niveles séricos de FGF23 previo a la elevación de fosfato en suero, sugiriendo que  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce la expresión de FGF23 independientemente de los cambios en el fosfato sérico. En cambio, el incremento de FGF23 suprime la expresión de  $1\alpha(\text{OH})\text{asa}$  e induce  $24(\text{OH})\text{asa}$  en el riñón. Este factor reduce los niveles de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por síntesis inhibitoria y promueve el catabolismo de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , lo cual a su vez disminuye la expresión de FGF23 en hueso, formando un circuito de retroalimentación negativa entre FGF23 y el sistema endocrino de vitamina D. La sobreactividad del FGF23 se ha propuesto como un mecanismo patogénico de enfermedades perdedoras de fosfato lo que puede explicar sus características clínicas compartidas, como hipofosfatemia, niveles bajos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y raquitismo/osteomalacia(Christakos, 2010).

## **ESTROGENOS**

La deficiencia de estrógenos tiene un papel principal en el desarrollo de OPS que se basó inicialmente en la observación de que las mujeres postmenopáusicas con niveles bajos de estrógeno en suero mostraban un mayor riesgo de desarrollar OPS. A nivel morfológico y metabólico algunos estudios han demostrado que el remodelamiento óseo se incrementa con la menopausia (Ebeling, 1996; Parfitt, 1995). La deficiencia de estrógenos asociada con pérdida de tejido óseo es compleja y ocurre más como



resultado del incremento en la resorción ósea y en menor grado de la deficiente formación de hueso nuevo. Sin embargo, la pérdida de hueso persistente después de la menopausia indica que hay también un defecto de la función osteoblástica dado que el incremento en la resorción no se acompaña de un incremento en la formación del hueso. Es interesante que el incremento en la formación de hueso como reacción a la carga mecánica, la cual ha sido demostrada como una reacción fisiológica, se pierde en la deficiencia de estrógenos.

La sustitución de estrógenos en la mujer después de los 70 y 80 años produce una clara reducción de la resorción ósea. Los niveles de estrógenos necesarios para conservar el proceso de remodelación fisiológico son notablemente más bajos que los necesarios para una estimulación de otros órganos blanco, como las glándulas mamarias y el útero (Prestwood, 2000). El riesgo de fractura se correlaciona inversamente con los niveles de estrógeno en la postmenopáusia y para estimular la resorción ósea e incrementar la formación de hueso sólo se necesita un 25 % de la dosis necesaria para estimular el tejido mamario y el útero (Prestwood, 2003). Los estrógenos ejercen su acción a través de dos receptores diferentes el receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y el receptor de estrógenos beta ( $ER\beta$ ).  $ER\alpha$  es un receptor esencial para el efecto estrogénico en el hueso (Lee, 2003; Sims, 2002; Windahl, 2001).

## **MECANISMOS DE ACCION DE LOS ESTROGENOS SOBRE EL HUESO**

Aunque el efecto de los estrógenos sobre el hueso es generalmente considerado en el contexto de la deficiencia de estrógenos después de la menopausia, es importante considerar que el mayor efecto fisiológico de los estrógenos es principalmente durante el crecimiento y el embarazo, y la deficiencia de estrógenos es más relevante durante la lactancia. La evidencia actual indica un rol mayor para los estrógenos en el tejido óseo durante el crecimiento en ambos sexos y durante el embarazo. Los altos niveles de estrógenos circulantes tienen efectos importantes no solo para el hueso, sino para la homeostasis del calcio extraesquelético (regulación a nivel intestinal y renal). Además, estudios en ratones y humanos han demostrado que la supresión de estrógenos durante la lactancia, combinada con el incremento en los niveles de proteína relacionada a hormona paratiroidea (PTHrP), son responsables para la movilización de calcio del esqueleto hacia la leche materna. En términos evolutivos, la provisión de adecuadas concentraciones de calcio en la leche materna son necesarias para el esqueleto del neonato, esto es probablemente la principal razón del por qué la deficiencia de estrógenos genera el incremento en la resorción ósea y la movilización de calcio. Aunque después de la lactancia la pérdida ósea es reversible, la pérdida de éste tejido durante la menopausia no lo es.

La activación del ER $\alpha$  estimula la apoptosis de los osteoclastos y suprime la actividad de osteoblastos y la apoptosis de osteocitos. Además, la deficiencia de estrógenos se asocia con un incremento en la vida media de los osteoclastos y una disminución en la vida media de osteoblastos.

La deficiencia de estrógenos se asocia con un incremento en los niveles de citosinas pro-resorción, incluyendo el  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL.1-}\alpha$  y otras. Aunque muchos datos de la regulación de estrógenos de estas citosinas provienen de estudios en roedores, la evidencia apoya el papel mediador de  $\text{TNF}\alpha$  y de  $\text{IL-1}$  para el incremento en la resorción ósea posterior a la deficiencia de estrógenos en humanos.

Las citosinas pro-resorción incrementan la cantidad de células precursoras de osteoclastos y también la expresión de moléculas reguladoras del desarrollo de osteoclastos, actividad y vida media a través de RANKL. Finalmente, la deficiencia de estrógenos sobre regula la osteoblastogénesis e incrementa el número de células T, ambas producen RANKL, el cual produce el desarrollo incrementado de osteoclastos.

### **METABOLISMO DE HOMOCISTEÍNA Y DENSIDAD MINERAL ÓSEA**

La homocisteína es un aminoácido que contiene azufre producido por la desmetilación de la metionina, un aminoácido esencial encontrando en alimentos ricos en proteínas. La homocisteína posee un grupo tiol (-SH) que es oxidado fácilmente, lo que permite a la molécula unirse a proteínas otros compuestos tioles (ej. cisteína y homocisteína) mediante la formación de puentes disulfuro. El catabolismo se realiza a través de dos vías hepáticas de importancia cuantitativa similar, la vía de transulfuración y remetilación. En la vía de transulfuración, el tiol de la homocisteína es transferido, en dos pasos, a serina, la cual es convertida a cisteína. Los átomos de carbono restantes de

la molécula de homocisteína que entran al ciclo Krebs. La otra vía consiste de la metilación de homocisteína a 1-metionina. En esta región participan enzima 5-metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), cuya coenzima es la vitamina B12. Existe una correlación inversa entre la actividad de la MTHFR y los niveles de homocisteína en suero, a menor actividad enzimática mayor elevación de la homocisteína. Existen diversos factores que pueden disminuir la actividad de la MTHFR, entre ellos las mutaciones, polimorfismos genéticos, deficiencias de folatos y vitaminas B6 y B12. El polimorfismo mejor estudiado de la *MTHFR* es C677T (Ala→Val) caracterizado por una sustitución de citosina por timina en el nucleótido 677, el cual produce un cambio de alanina por valina en la cadena de aminoácidos. Este cambio afecta la estabilidad de la enzima y disminuye su actividad. El polimorfismo C677T se encuentran aproximadamente 10% de los caucásicos y si es una causa de hiperhomocisteinemia (Cortese y Motti 2001). La importancia de las interacciones entre factores ambientales y genéticos queda demostrada cuando disminuye el riesgo cardiovascular asociado hiperhomocisteinemia en pacientes con niveles de folatos y vitamina B12 por arriba del 50% de su valor normal. Los niveles plasmáticos de homocisteína pueden ser regulados por muchos compuestos. Los que incrementan los niveles de homocisteína son: antagonistas de los folatos (ej. metotrexate, anticonvulsivantes), antagonistas de la vitamina B6 (ej. isoniazida, procarbazina), antagonistas de la vitamina B12 (óxido nítrico). Los que disminuyen los niveles de homocisteína: ácido fólico, vitamina B6 y B12, 2-Deoxicoformicina o pentostanina y d-penicilamina. La suplementación con folatos ayuda a los

pacientes que reciben metotrexate en enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide (Ortiz, 2000; Van Ede, 2002).

El efecto de la homocisteína sobre la DMO puede ser mediado principalmente por su unión con colágena, lo cual interfiere con la formación de uniones de colágena tipo 1 (Jackson 1973). Los niveles séricos de las uniones entre colágena tipo 1 están significativamente disminuidos en pacientes jóvenes con homocisteinuria, mientras que los niveles de moléculas que reflejan la producción de colágena tipo 1 o tipo 3 son normales (Lubec, 1996). La magnitud de la disminución de las uniones no se correlaciona con los niveles séricos de homocisteína. La cantidad de colágena producida parece normal, de esta forma la única anomalía es un defecto cualitativo en dichas uniones. Este hecho puede explicar las dificultades para correlacionar los valores de DMO con los niveles séricos de homocisteína (Van Meurs, 2004).

*Modelos genéticos de hiperhomocisteína.* El primer modelo de ratón generado por ingeniería genética fue descrito en 1995 (Watanabe, 1995). Los homocigotos para la mutación que carecían de la enzima cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS  $-/-$ ) tuvieron niveles de homocisteína 40 veces más el valor normal, retraso severo del crecimiento, hígado graso, y una alta mortalidad dentro de las 5 semanas después del nacimiento. La raza C57BL/6J de ratón CBS $^{-/-}$  mostraba defectos en el crecimiento de los huesos largos, principalmente aquellos localizados de forma proximal, como un resultado de alteraciones en la osificación endondral (Robert, 2005). El peso corporal

estaba disminuido 25% comparado con el ratón control. El examen histológico del esqueleto del ratón CBS<sup>-/-</sup> en el primer mes de edad mostraba expansión de la placa de crecimiento con condrocitos hipertróficos desorganizados lo cual sugiere un retraso de la diferenciación. Al tercer mes de edad, los huesos del fémur y tibia fueron cortos, mientras que el humero y cúbito no fueron diferentes de los controles. Además presentaban cifoescoliosis y aracnodactilia.

Las ratas hembras Wistar con hiperhomocisteinemia inducida por una dieta enriquecida en metionina o en homocisteína mostraron anomalías óseas (Herrmann, 2007b). Los niveles de homocisteína en plasma en el grupo alimentado con una dieta enriquecida en homocisteína fueron 10 veces mayores que los controles. El examen histológico de los huesos del fémur y vertebras L1 de animales con hiperhomocisteinemia mostró una importante pérdida del hueso trabecular (93% de disminución en el área ósea / área total del fémur distal) comparados con controles. Estos modelos mostraban alteraciones en la microarquitectura y disminución de la fuerza mecánica en el cuello femoral. Estos cambios fueron atribuibles a la disminución en la formación de hueso. La resorción ósea no se modificó en ambos grupos. Estos mismos investigadores mostraron que tejido de osteoclastos humanos cultivados expuestos a niveles elevados de homocisteína o niveles bajos de vitamina B6, vitamina B12 y folatos tuvieron un incremento en la actividad de TRAP5b y catepsina K (Herrmann, 2007a).

En modelos de pollo en desarrollo la suplementación de la dieta con homocisteína a las 8 semanas fue asociada con un incremento significativo en la ganancia de peso y el crecimiento radial y longitudinal de las diáfisis de la tibia, comparadas con controles. Además estos modelos mostraron cambios en la composición mineral, anormalidades de la matriz ósea y defectos de colágena (Massé, 2003).

Estudios de modelos celulares y mineralización. La homocisteína causa apoptosis de células mesenquimatosas de la médula ósea por mecanismos que involucran especies reactivas de oxígeno y NF-kappaB (Kim, 2006). La homocisteína estimula la formación de osteoclastos por activación de especies reactivas de oxígeno, lo cual promueve la resorción ósea (Koh, 2006). El desarrollo de uniones de colágena es dependiente de enzimas, como la lisil oxidasa, y factores no enzimáticos responsables de glucosilación de proteínas. Las uniones de colágena son uno de los principales determinantes de la calidad ósea, junto con el grado de mineralización, el cual también controla la maduración de éstas uniones. Los cofactores de la enzima lisil oxidasa son la vitamina B6 (piridoxal) y cobre. Un estudio realizado en muestras de tejido óseo de pacientes con fracturas de cuello femoral mostró alteraciones en las uniones y disminución de la actividad enzimática así como un incremento en los niveles de pentosidina (un marcador de maduración de colágena), tanto en densidad ósea disminuida como elevada (Saito, 2006).

Estudios en humanos han reportado hallazgos contradictorios respecto a los niveles de homocisteína circulantes y riesgo de fracturas o efecto sobre la DMO. Algunos estudios que han mostrado una asociación entre niveles de homocisteína y riesgo de fracturas. El primero de estos estudios se realizó en 2406 individuos mayores de 50 años de edad en Holanda, en este estudio se encontró que los niveles de homocisteína se correlacionaron significativamente con el riesgo de fracturas por 11,253 años persona de seguimiento (Van Meurs, 2004). En este estudio, cada incremento de 1 desviación estándar en el nivel de homocisteína se asoció con un riesgo relativo de fracturas de 1.9 (IC 95% 1.4-2.6), independientemente del valor de DMO. En el estudio Framingham realizado en 1174 mujeres y 825 hombres con edades entre 59 y 91 años, los niveles de homocisteína fueron asociados con la ocurrencia de fracturas de cadera (McLean, 2004). El riesgo de sufrir una fractura de cadera se incrementó 4 veces en hombres y 1.9 veces en mujeres en el cuartil más alto, comparados con el cuartil más bajo (McLean, 2004). Además, 2/3 de los casos en los que se observó elevación en los niveles de homocisteína fueron atribuibles a una disminución en la vitamina B12 y folatos o su ingesta (Selhub 2006). Otro de estos estudios se realizó en 433 pacientes mayores de 65 años con hemiplejía debida a un evento isquémico, la homocisteína al inicio del estudio se asoció con la ocurrencia de fracturas de cadera durante un promedio de 9 años seguimiento (Sato, 2005b). La tasa de incidencia por 1000 años persona ajustada para la edad se incrementó de 2.89 para el cuartil más bajo a 27.9 en el cuartil más alto. De forma similar, en 199 mujeres quienes tomaban levodopa para enfermedad de Parkinson, el riesgo de fracturas de cadera fue 2.4 veces más



alto en el cuartil más alto que en el cuartil más bajo (Sato, 2005c). Por otra parte, un ensayo clínico controlado aleatorizado en pacientes de 65 años y más quienes tuvieron hemiplejía al menos 1 año después de un evento isquémico, la suplementación con folatos (5 mg/d) y vitamina B12 (1500 µg/d) disminuyó los niveles de homocisteína y el riesgo de fractura de cadera comparada con los controles (Sato, 2005a). Gjesdal y cols. en un estudio poblacional prospectivo incluyeron 2639 mujeres y 2127 hombres con edades entre 65 y 67 años al inicio del estudio y quienes fueron seguidos por un promedio de 12.6 años, los niveles de homocisteína al inicio del estudio se correlacionaron con mayor riesgo en mujeres de fractura de cadera (Razón de Riesgos ajustada 2.42, IC95% 1.43-4.09) (Gjesdal, 2007). Por otra parte, en 92 pacientes con enfermedad de Crohn, 60% tuvieron niveles de homocisteína en plasma mayores de 15 µmol/L, lo cual fue asociado con OPS o disminución en la DMO (28% y 65% de pacientes, respectivamente) (Roblin, 2007). Algunos estudios han mostrado asociaciones entre la deficiencia de folatos inducida por fármacos antiepilépticos. La implementación con folatos y vitamina B (además de vitamina D y calcio) se recomienda para pacientes epilépticos con el propósito de disminuir los niveles de homocisteína, prevenir la pérdida de la DMO y disminuir el riesgo de fracturas de bajo impacto (Elliott, 2007).

Por otra parte, múltiples estudios no han podido demostrar asociación entre homocisteína y fracturas o densidad mineral ósea. El estudio francés OFELY incluyó una cohorte de 671 mujeres con un promedio de edad de  $62.2 \pm 9$  años y un promedio de seguimiento de 10 años, en este estudio los niveles

de homocisteína no demostraron asociación con el riesgo de fracturas después de ajustar para la edad (Périer, 2007). En este mismo estudio los niveles de homocisteína tampoco se asociaron con los valores de DMO o algunos otros marcadores de remodelación ósea. Otro estudio realizado en Suecia 1996 mujeres de 75 años de edad encontró que altos niveles de homocisteína se correlacionaron con mayor remodelación ósea, pobre desarrollo físico, y menores valores de DMO pero no con un incremento en la incidencia de fracturas para un promedio de 7 años de seguimiento (Gerdhem, 2007). En Italia, se realizó un estudio en 702 individuos entre 65 y 94 años de edad, los niveles de folatos pero no de homocisteína predijeron el riesgo de fracturas para los siguientes 4 años (Ravaglia, 2005).

## **PATOGÉNESIS DE LAS FRACTURA**

La importancia clínica y económica de la osteoporosis está en su asociación con fracturas. Aunque el riesgo de fracturas se incrementa cuando los valores de la DMO caen, dos tercios aproximadamente de individuos quienes sufren una fractura no tienen osteoporosis definida sobre la base de los valores de DMO. De acuerdo con lo anterior, el incremento en las fracturas relacionado con la edad es independiente de los cambios en la DMO. La razón más probable para esto es un riesgo incrementado de caídas con el envejecimiento debido a factores como fuerza muscular reducida, inestabilidad postural y agudeza visual reducida.

Otros factores también afectan el riesgo de fracturas por mecanismos independientes de la DMO. Por ejemplo, marcadores bioquímicos de resorción ósea (C-telopéptido de colágena tipo I y deoxipiridinolina) y marcadores de formación de hueso (osteocalcina carboxilasa), han demostrado ser predictores independientes de la DMO. De modo semejante, varios aspectos en la geometría del cuello femoral como la longitud axis cadera, también han demostrado ser predictores de fracturas, particularmente de cadera.

Además, se ha sugerido que diferencias en la geometría del cuello femoral pueden explicar, en parte, diferencias en la tasa de fracturas entre caucásicos y algunos otros grupos étnicos. En vista de lo anterior puede ser

apreciado que las fracturas son un componente complejo del fenotipo que es muy desafiante para ser considerado en el análisis genético.

La vitamina D modula el riesgo de fracturas de dos formas, la primera disminuyendo las caídas y la segunda incrementando la densidad ósea. La administración en forma suplementaria de vitamina D disminuye el riesgo de caídas en 19% a dosis de 700 a 1000 unidades internacionales (UI) por día, el riesgo de fractura de cadera en 18% y el riesgo de alguna fractura novertebral en 20% dosis de 482 a 770 UI por día.

## HEREDABILIDAD DE LA OSTEOPOROSIS-RASGO RELACIONADO

En enfermedades multifactoriales como la OPS, la varianza poblacional de un fenotipo cuantitativo es determinada por la interacción del genotipo con el ambiente. Un estimado de heredabilidad considera la varianza en la población como resultado tanto de factores genéticos como ambientales. Una forma de calcular la heredabilidad es mediante los estudios en gemelos. Los gemelos monocigotos (MZ) tienen 100% de alelos en común, mientras que los dicigotos (DZ) tienen 50% de alelos en común. Por tanto, una disminución en la varianza fenotípica en gemelos MZ comparada con gemelos DZ refleja la contribución genética. Una premisa de éste modelo es que el grado en el cual los gemelos MZ comparten un ambiente en común es el mismo que para los gemelos DZ. Esto sucede con poca frecuencia y por lo general sobreestima la heredabilidad. La heredabilidad por encima de la unidad puede reflejar violaciones de la premisa de que los gemelos MZ y DZ tienen contribuciones similares de los ambientes que comparten.

Para evaluar fenotipos concordantes se utiliza la correlación entre pares de gemelos como un estimado de esta asociación. Por lo tanto, la correlación intraclase es el estimado de la varianza entre pares de gemelos en relación a la varianza entre todos los pares de gemelos. Se calcula de la siguiente manera: (medias cuadradas intra pares - medias cuadradas entre pares) / (medias cuadradas intra pares + medias cuadradas entre pares). El estimado estadístico es  $h^2 = 2 ( r_{MZ} - r_{DZ} )$ , donde  $r_{MZ}$  y  $r_{DZ}$  son la correlación intra clase para gemelos MZ y DZ, respectivamente.  $h^2$  es un estimado de la

proporción de variación en el fenotipo que es genéticamente determinado. Este modelo puede ser extendido a la heredabilidad entre familiares de primer grado. En este caso,  $h^2 = 2 \times r$  es para familiares de primer grado como hermanos o progenitores.

Estudios en las últimas tres décadas en gemelos sanos han demostrado consistentemente una importante contribución de los genes sobre la masa ósea y algunas características del hueso (véase *tabla 2*), incluso conforme avanza la edad. Diversos estudios en familias con pares padres-hijos sanos, pares hermanas sanas y niños con pares padres-hijos en quienes el padre tenía OPS han confirmado el papel predominante de los genes para determinar la masa ósea y algunos fenotipos rasgo relacionados.

## ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA OSTEOPOROSIS

En los últimos 15 años, un gran número de genes han sido asociados con osteoporosis. La identificación y validación de loci de susceptibilidad a osteoporosis se incrementa año con año. Este fenómeno es debido principalmente por los estudios de asociación a gran escala gen candidato, metanálisis y estudios de genoma completo.

### RECEPTOR DE VITAMINA D

El gen del receptor de vitamina D fue el primer gen candidato estudiado en pacientes con osteoporosis (Morrison, 1994). El análisis a gran escala de SNPs en 6,148 ancianos blancos observó que ciertos haplotipos en la región promotora y la región 3' no traducida (3'-UTR) se asociaron fuertemente con un incremento en el riesgo de fracturas. Específicamente, las asociaciones fueron independientes de la DMO sugiriendo la existencia de otros mecanismos determinantes del riesgo (Fang, 2005). El análisis funcional *in vitro* indicó que un haplotipo de riesgo en el promotor se asoció con una expresión reducida del gen reportero y un haplotipo de la región 3'-UTR con una disminución del RNAm (Fang, 2005).

Un metanálisis en el que participaron 9 centros de investigación europeos con 26,242 participantes estudió los polimorfismos *Cdx2* (localizado en el promotor), *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* confirmó parcialmente los resultados mencionados. En este estudio los polimorfismos estudiados no mostraron

asociación con DMO y el alelo A de *Cdx2* mostró una reducción de 9% del riesgo para fracturas vertebrales ( $P = 0.039$ ) (Uitterlinden, 2006). El análisis funcional *in vitro* demostró que el alelo A de *Cdx2* tiene mayor afinidad por el factor de transcripción *Cdx2* y significativamente mayor actividad en comparación con el alelo G.

El polimorfismo *FokI* presenta un cambio de C por T en el exón 2 del gen *VDR* (rs10735810). Esto introduce un nuevo sitio de inicio de transcripción, lo cual resulta en la generación de una proteína con 3 aminoácidos adicionales (C=424 aa, T=427 aa). Este es un polimorfismo funcional debido a tres líneas de evidencia. La primera, el alelo C exhibe una mayor actividad de transactivación que el alelo T, como lo demostró el reportero construido bajo el control del elemento de respuesta a vitamina D en varias líneas celulares. La segunda, una proteína más corta interactúa más eficientemente con el factor de transcripción basal, IIB, y posee mayor actividad transcripcional que su contraparte de más longitud en células epiteliales de riñón de mono COS-7. Por último, el genotipo C es más sensible a 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub>, la forma principal bioactiva de vitamina D en células mononucleares de sangre periférica humana cultivada.

Si estos resultados son considerados en el contexto de los hallazgos de Arai y cols (2001), Fang y cols (2005) y Uitterlinden y cols (2006), es claro un efecto protector del genotipo C contra osteoporosis. Sin embargo, el análisis del polimorfismo *FokI* en 6,698 mujeres Americanas de  $\geq 65$  años de edad mostró un efecto opuesto; las mujeres con el genotipo CC fueron asociadas



con disminución significativa de la DMO en la región distal del radio, un incremento modesto del riesgo fracturas de bajo trauma y un 33% de incremento en el riesgo de fractura de muñeca comparado con aquellos con el genotipo TT (Moffett, 2007).

Onder y cols estudiaron *FokI* y *BsmI* en 259 individuos de 80 años con respecto a la ocurrencia de caídas dentro de los 90 días de la valoración (Onder, 2008). El genotipo bb en *BsmI* fue asociado con una tasa reducida de caídas comparada con el genotipo BB. En contraste, ningún efecto sobre las caídas fue observado para el polimorfismo *FokI*. Este hallazgo fue apoyado por un estudio que incluyó dos grandes cohortes y estudió el riesgo de fracturas con el *VDR* (Barr, 2010).

En México, Lisker y cols estudiaron 65 mujeres con OPS y 57 mujeres control en la posmenopausia y los resultados no mostraron asociación de *FokI* con OPS, sin embargo el genotipo bb de *BsmI* tuvo una mayor prevalencia en mujeres posmenopáusicas con OPS que en controles, a diferencia del efecto protector reportado en otros estudios (Lisker, 2003). Por otra parte, Jaramillo y cols evaluaron 98 mujeres mexicanas sin OPS (19 del grupo premenopausia y 79 del grupo posmenopausia) con promedio de edad de  $55 \pm 10$  años de edad para los polimorfismos *Apal*, *BsmI* y *TaqI* del gen *VDR*, en estos grupos no se observaron diferencias entre la DMO y los genotipos estudiados (Jaramillo-Rangel, 1999).

## ESTRÓGENOS

La vía endocrina de los estrógenos tiene una función muy importante en la regulación de la masa ósea y la ocurrencia de osteoporosis. Por ejemplo, la terapia de reemplazo con estrógenos en la mujer postmenopáusica previene la pérdida ósea (Felson, 1993) y disminuye el riesgo de fracturas osteoporóticas (Cauley, 1995). Además, los estrógenos al activar su receptor generan regulación por sobreexpresión de muchos genes. Aunque las mutaciones se consideraban letales, se ha reportado el caso de un hombre adulto portador de una mutación con pérdida de función para el receptor de estrógenos (*ESR1*) el cual desarrolló disminución de la DMO como resultado de un incremento en la remodelación ósea (Smith, 1994). Por otra parte, el ratón *Esr1<sup>-/-</sup>* también exhibe una masa ósea disminuida (Korach 1994).

### ***ESR1***

El receptor de estrógenos tipo 1 (*ESR1*) es uno de los genes candidatos más extensamente estudiados para osteoporosis, y ha sido motivo de la publicación de tres metanálisis. El primero de estos estudios evaluó los polimorfismos en el intrón 1 *Xbal* (rs9340799) y *PvuII* (rs2234693) de 5,834 mujeres de 30 grupos de estudios y se observó que los homocigotos “XX” tuvieron una mayor DMO y una disminución del riesgo de fracturas comparados con los portadores del alelo “x”, pero el polimorfismo *PvuII* no mostró efecto sobre la DMO ni para el riesgo de fracturas (Ioannidis, 2002).

Ioannidis y cols evaluaron los 2 polimorfismos antes mencionados junto con el repetido dinucleótido TA en el promotor en 18,917 sujetos de 8 centros europeos y solo reportaron una asociación de *Xbal* con disminución en el

riesgo de fracturas (Ioannidis, 2004). En este estudio, la escasa asociación con la DMO se consideró potencialmente relevante a nivel clínico porque dio información sobre el riesgo de fracturas que no podía ser obtenida con la medición de la DMO. En este sentido, se señala que un haplotipo *ESR1* fue asociado con calidad ósea (Albagha, 2005).

Wang y cols publicaron un metanálisis sobre 4,297 mujeres originarias de China de 16 estudios sobre los polimorfismos *Xbal* y *PvuII*, en este estudio solo se encontró una débil asociación entre el polimorfismo *PvuII* y la DMO del cuello femoral (Wang, 2007). Por otra parte, en estudios *in vitro* los polimorfismos *Xbal* y *PvuII* han demostrado tener una influencia sobre la expresión de genes reporteros (Herrington, 2002; Maruyama, 2000).

En un estudio de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) se observó que el SNP rs1999805 localizado en un intrón de la variante de empalme U68068 de *ESR1* fue asociado con DMO ( $P = 3.8 \times 10^{-7}$ ) (Styrkarsdottir, 2008). Esta asociación fue confirmada por una metanálisis a gran escala de 5 GWAS (Rivadeneira, 2009). Interesantemente estos dos estudios sugieren que existe más de una señal asociada en la región del *ESR1*. De acuerdo con estos hallazgos, los SNPs en el *ESR1* también han sido reportados por estudios de asociación de gen candidato (CGAS por sus siglas en inglés).

Wang y cols genotipificaron 25 SNPs en *ESR1* en 700 individuos Chinos e identificaron una asociación entre 2 nuevos SNPs (rs3020314 y rs1884051) y

fractura de cadera (Wang, 2008). Por otra parte, Lai y cols (2008) genotipificaron el dinucleótido CA repetido polimórfico del *ESR1* en 452 pre, 110 peri y 622 posmenopáusicas del sureste de China; el polimorfismo se asoció con variación en la DMO, la tasa de pérdida ósea y el riesgo de fracturas en mujeres post pero no premenopáusicas (Lai, 2008).

En México, Gómez y cols estudiaron los polimorfismos del *ESR1*, el G2014A (rs2228480) y el repetido dinucleótido TA en 70 mujeres con OPS, 10 mujeres sin OPS y 500 individuos de población mexicana. Los resultados mostraron asociación del polimorfismo G2014A con OPS no así con el repetido dinucleótido TA. Los portadores del alelo G tuvieron menor DMO comparado con los portadores del alelo A (Gomez, 2007).

### ***COL1A1***

El gen *COL1A1* localizado en el cromosoma 17q21.33 codifica para la proteína colágena tipo I  $\alpha$ -1 principal componente de la matriz ósea extracelular. Mutaciones en el gen *COL1A1* causan Osteogénesis Imperfecta, enfermedad caracterizada principalmente por múltiples fracturas óseas (Pope, 1985). El gen *COL1A1* es también uno de los genes de susceptibilidad candidatos para osteoporosis más estudiados. La mayoría de los estudios se enfocan sobre el polimorfismo +1254G/T, rs1800012, el cual afecta al sitio de unión de Sp1 en el intrón 1 (Liu, 2006; Ralston y de Crombrughe 2006). El alelo T se asocia con un incremento en la producción del RNAm y proteína del gen *COL1A1* debido a su mayor afinidad por Sp1, el resultado es el desequilibrio en la cantidad producida de las cadenas  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 lo cual deteriora la fuerza ósea y disminuye la masa al afectar la mineralización

(Mann, 2001; Stewart, 2005).

Un metanálisis de 26 estudios publicados con 7,849 participantes mostró que la presencia del alelo T fue asociada con una reducción modesta en la DMO y un incremento significativo en el riesgo de fracturas vertebrales. Posteriormente otro metanálisis con 20,786 individuos de varios países europeos observó que sólo homocigotos para el alelo T fueron asociados con DMO y fracturas incidentales (Ralston, 2006). Interesantemente, ambos estudios indicaron que el polimorfismo Sp1 puede predisponer a fracturas vertebrales independiente de un efecto sobre la DMO, consistente con el efecto experimental observado del polimorfismo sobre la calidad ósea (Stewart, 2005).

En México, Falcon y cols estudiaron el sitio de unión a Sp1 en 100 mujeres con osteoporosis y 100 mujeres control. Los resultados muestran que la frecuencia del alelo T fue mayor en las mujeres con OPS (35%) que en controles (11%). Además, el genotipo TT sólo fue encontrado en mujeres con OPS y se asoció significativamente con una disminución de la DMO ( $0.588 \pm 0.077 \text{ g/cm}^2$ ) vs el genotipo GG ( $0.733 \pm 0.039 \text{ g/cm}^2$ ). Los resultados de éste estudio concuerdan con los publicados en otras poblaciones indicando una asociación del polimorfismo de Sp1 con la DMO y OPS (Falcon-Ramirez, 2011).

### ***MTHFR*, DMO Y RIESGO DE FRACTURAS**

La enzima MTHFR cataliza la conversión de 5,10 metilendetrahidrofolato a 5 metilendetrahidrofolato y ejerce una función importante en la remoción de la homocisteína circulante por la vía del ciclo de la metionina. El gen de *MTHFR* se localiza en el cromosoma 1p36 dentro de una región de ligamento para la regulación de la DMO (Devoto, 2001). Dos polimorfismos funcionales han sido identificados C677T y A1298C los cuales producen sustituciones de aminoácidos en la proteína y son asociados con mayores niveles de homocisteína en plasma lo cual puede afectar la maduración de la colágena (Lubec, 1996). El polimorfismo C677T del gen de la *MTHFR* ha sido previamente asociado con la DMO en algunos estudios, pero también hay resultados contradictorios. En un metanálisis reciente, Wang y Liu evaluaron la asociación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* con la DMO y el riesgo de fracturas, en este estudio se concluye que el polimorfismo fue asociado marginalmente con el riesgo de fracturas y modestamente asociado con la DMO en columna lumbar, cuello femoral, cadera y la masa ósea total (Wang y Liu 2011). Previamente un metanálisis sugirió que no existía asociación entre el polimorfismo C677T y fracturas (Valero, 2007) y otro metanálisis indicó que si existía una asociación del polimorfismo con la DMO en columna lumbar y cadera (Riancho, 2006). En este mismo estudio se señala que los individuos con el genotipo TT tuvieron significativamente menor DMO comparado con los portadores del genotipo CT y CC (Riancho, 2006). En Japón, se estudiaron 307 mujeres en la posmenopausia, para el polimorfismo C677T de *MTHFR* y se observó que los pacientes homocigotos para TT tuvieron niveles de homocisteína más altos y niveles de DMO más bajos en la columna lumbar y el resto del esqueleto que aquellos pacientes homocigotos

CC (Miyao, 2000). Otro estudio realizado en 780 hombres sanos de origen danés entre 20 y 29 años de edad, mostraron que el número de copias del alelo T de *MTHFR* C677T fueron asociadas significativamente con menor pico de masa ósea (Abrahamsen, 2006). En China, Hong y cols. estudiaron 1899 mujeres en la posmenopausia, 39.2% eran portadoras del alelo T, y el genotipo TT no se asocia con osteopenia u osteoporosis pero si fue asociado con el riesgo de fracturas (RR 1.7; IC95% 1.1-2.7) (Hong, 2007). Además, en este estudio se señala que el polimorfismo C677T de *MTHFR* puede predecir el riesgo de fracturas independientemente de los valores de densidad mineral ósea. En otro estudio realizado por Huang y cols. también en población China, 1243 individuos se observó asociación alélica y fenotípica del polimorfismo C677T con la DMO en todos los sitios medidos y una interacción gen-gen para dos loci para la DMO en cuello femoral. En Dinamarca una comparación de genotipos del polimorfismo C677T en 388 pacientes con osteoporosis y 386 individuos control, observó que el genotipo TT fue significativamente más común entre mujeres con fracturas de columna vertebral que en controles (14.3% vs 8%) (Villadsen, 2005). Otro estudio también realizado en Dinamarca en 1748 mujeres sanas en la posmenopausia, demostró que el genotipo TT del polimorfismo C677T fue significativamente asociado con mayor riesgo de fracturas y menores niveles de DMO en cadera y columna lumbar (Abrahamsen, 2003). En gemelos de origen danés de 73 años o más, el alelo T fue asociado con un incremento de 1.5 veces el riesgo de fracturas (Bathum, 2004). En Noruega se realizó un estudio poblacional en el que se encontró correlación entre niveles de homocisteína elevados y valores bajos de DMO en mujeres pero no en

hombres (Refsum, 2006). En este estudio se observó que el riesgo de osteoporosis se incrementó 2.8 veces (IC95% 1.6-5) en mujeres cuyos niveles de homocisteína en plasma fueron mayores de 15  $\mu\text{mol/L}$ , comparadas con quienes tuvieron niveles menores de 9  $\mu\text{mol/L}$ .

Algunos otros estudios no han logrado demostrar asociación entre polimorfismos de *MTHFR* y fracturas o densidad mineral ósea. Uno de estos estudios se realizó en 271 mujeres en la posmenopausia de origen iraní en el cual no se encontró asociación de los polimorfismos con la DMO a nivel de la columna lumbar o fémur (Golbahar, 2004). Otro estudio realizado en Escocia evaluó longitudinalmente a 1241 mujeres entre 45 a 54 años de edad y mostró una correlación positiva entre la ingesta rivotravina (vitamina B2) y DMO en cuello femoral en individuos con el genotipo TT de *MTHFR* (Macdonald, 2004). Por otra parte, un estudio realizado en Dinamarca en mujeres sanas en la posmenopausia, se encontró que bajos niveles de densidad mineral ósea en personas que tienen el genotipo TT se correlacionaba con baja ingesta de vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12 y folatos (Abrahamsen, 2005). En una cohorte Danés, niveles elevados de homocisteína y bajos de folatos se correlacionaron con disminución en la densidad mineral ósea en mujeres pero no en hombres (Gjesdal, 2006). De acuerdo con este estudio se señala que la densidad mineral ósea no se correlaciona con vitamina B12 ni con los polimorfismos C677T y A1298C de *MTHFR*. Otro estudio realizado en 328 mujeres de origen británico en la posmenopausia encontró una correlación significativa entre niveles bajos de folatos séricos con disminución de la densidad mineral ósea, aún después de



ajustar para edad, peso, y talla ( $P= 0.042$ ) (Baines, 2007). En Taiwan, el estudio de 1677 personas mayores de 60 años mostró que niveles elevados de homocisteína se correlacionan con pobre desarrollo físico lo cual se asoció un incremento en el riesgo de caídas (Kuo, 2007). Finalmente, en un estudio de 143 mujeres peri y postmenopáusicas de Alemania, el marcador urinario de reabsorción ósea desoxipiridinolina y calcio sérico mostró una asociación débil pero significativo con los niveles de homocisteína en plasma (Herrmann, 2005a).

En resumen los datos disponibles sugieren que la hiperhomocisteinemia puede interferir con la calidad del tejido óseo, alterando primariamente las propiedades de unión de la colágena (Levasseur 2009). Además existe una asociación marginal del polimorfismo C677T con el riesgo de fracturas y DMO. Y los estudios recientes señalan la necesidad de considerar las interacciones gen-gen y gen-ambiente para lograr una mejor caracterización del efecto de la *MTHFR* en la regulación de la DMO (Wang y Liu 2011).

## **HIPÓTESIS**

La interacción génica entre variantes de genes del metabolismo de los folatos, del receptor de vitamina D, del receptor de estrógenos y de la colágena 1, afectan la DMO y confieren mayor riesgo para osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

## **OBJETIVO**

Investigar el efecto de la interacción génica de las variantes alélicas de los genes del *VDR*, de la *MTHFR*, de la metionina sintasa (*MTR*); de la metionina sintasa reductasa (*MTRR*); del transportador de cobalamina (*TCN2*); del *ESR1* y *COL1A1* sobre los valores de la DMO y riesgo para OPS.

## **METODOLOGÍA**

Diseño de estudio transversal, prolectivo, observacional, de casos y controles. La muestra estuvo integrada por 110 MPM con OPS y 110 mujeres MPM control pareadas por edad con una diferencia de  $\pm 3$  años, reclutadas de la consulta externa de nuestro Instituto durante el periodo 2005-2008. Se realizó densitometría de absorción de rayos X de energía dual a los pacientes en cadera para determinar la densidad mineral ósea.

Los casos cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: OPS confirmada por densitometría ósea en cuello femoral ( $\leq -2.5$  DE de DMO), con edad mayor a 50 años, sin enfermedad renal, hepática, endócrina o metabólica que afecte la DMO.

Los controles fueron mujeres sanas sin OPS confirmada por densitometría ósea en cuello femoral ( $\geq 1.5$  DE de DMO). Para fines de diferenciación de los grupos se consideró adecuado una DMO  $\geq -1.5$  DE, si bien la OMS establece como normal un puntaje T mayor a 1.

Cada participante fue informada de los objetivos y procedimientos del estudio y se obtuvo su consentimiento informado por escrito. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Bioética en Humanos del INCMNSZ.

### **VARIANTES ANALIZADAS**

Gen *VDR*: *BsmI* A>G (rs1544410), *FokI* T>C (rs2228570), *Apal* G>T (rs7975232) y *TaqI* T>C (rs731236); gen *MTHFR*: C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131); gen *MTR*: A2756G (rs1805087); gen *MTRR*: A66G (rs1801394); gen *TCN2*: C776G (rs1801198); gen *ESR1*: *XbaI* A>G (rs9340799), *PvuII* T>C (rs2234693) y gen *COL1A1*: *Sp1* G>T (rs1107946); (Tabla 3).

### **ANÁLISIS MOLECULAR**

Se extrajo ADN de muestras de sangre periférica por método estándar. Las variantes génicas se identificaron mediante PCR, RFLP's y electroforesis en geles de agarosa y acrilamida.

Los segmentos de interés para cada una de las variantes se amplificaron tomando en cuenta las *Tm* de los correspondientes oligonucleótidos para las mismas. Las secuencias de cada oligonucleótido son descritas en el anexo correspondiente (*Tabla 4*).

Los productos de la PCR se sometieron a digestión con enzimas de restricción: del *VDR* (*BsmI*, *Apal*, *FokI* y *TaqI*), del *ESR1* (*PvuII* y *XbaI*), de *MTHFR* C677T (*TaqI*), A1298C (*MboII*), de *MTR* (*HaeII*), de *MTRR* (*AflII*), de *TCN2* (*MvaI*) posteriormente se analizaron los patrones de electroforesis en geles de agarosa al 3% y acrilamida al 15% teñidos con bromuro de etidio.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para cada una de las variantes y se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis de interacción gen-gen y gen-ambiente realizó mediante los paquetes estadísticos STATA v10.1, PLINK v1.07 y MDR v2.0. El análisis de interacción génica se realizó mediante regresión logística binaria con STATA y PLINK. La significancia estadística de las interacciones fue evaluada por

medio del cociente de verosimilitud (*likelihood ratio test*) entre los modelos de interacción y no interacción.

El programa de análisis MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*) utiliza un método Bayesiano no paramétrico que complementó el análisis de regresión logística. El MDR se basa en la reducción de información para identificar combinaciones de genotipos en múltiples *loci* y factores ambientales discretos asociados con el mayor o menor riesgo de enfermedad (Moore 2004). El programa MDR define una variable que incorpora información de varios *loci* y factores ambientales que pueden ser divididos en combinaciones de alto y bajo riesgo (*Figura 1*). Esta nueva variable puede ser evaluada por su habilidad para clasificar y predecir un estado de riesgo.

De forma inicial, PLINK y STATA fueron usados para discriminar interacciones potenciales, mismas que posteriormente fueron confirmadas con MDR. Por último, a través de MDR y el análisis de entropía, basado en teorías de la información (Lavra\*c 2003), se visualizaron en forma gráfica las interacciones de interés y se observó la ganancia de información (de acuerdo al estado caso-control) del efecto combinado entre las diferentes variantes génicas.

La medición de la entropía nos permitió identificar efectos sinérgicos o nulos. El término entropía en el contexto de teorías de la información se define como la medición de información calculada a partir de la probabilidad de ocurrencia de diferentes eventos (Pierce 2003), lo que permite conocer la

magnitud de cada evento y su efecto conjunto, es decir la ganancia de información y la reducción de incertidumbre.

Para la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  y para las variables de tendencia central la U de Mann-Whitney y la "t" de Student. Para todas las comparaciones realizadas se consideró un valor de  $p < 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa (DES).

## RESULTADOS

El promedio de edad en los casos fue de 69.1 años (50-85 años) y en controles fue de 66.5 (51-85 años) no mostrando estos DES. El valor promedio de DMO ( $\text{gr/cm}^2$ ) para los casos fue de 0.54 ( $\pm 0.06$  DE) y para los controles de 0.76 ( $\pm 0.07$  DE) siendo estas DES ( $t$  24.22,  $p < 0.00001$ ). No se observaron DES entre casos y controles en las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes génicas analizadas, mismas que estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto para la variante *XbaI* del *ESR1* (Tabla 3). Tampoco se observaron DES en los valores de DMO para cada una de las variantes alélicas y genotípicas identificadas pero analizadas individualmente.

En cambio sí se observaron interacciones gen-gen estadísticamente significativas entre diversas variantes genotípicas del *VDR* (*FokI*, *BsmI*, *Apal*) con variantes genotípicas de *MTHFR*, *TCN2* y del *ESR1*, las cuales mostraron efectos de magnitud variable sobre la DMO. Las interacciones “*MTHFR-C677T* y *VDR-FokI*”, “*TCN2* y *VDR-Apal*”, “*TCN2* y *ESR1-PvuII*”, “*VDR-FokI* y *TCN2*”, mostraron las siguientes razones de momios (RM) e intervalos de confianza del 95%: 2.68 (1.54-4.65), 2.52 (1.46-4.34), 2.83 (1.64-4.90), 2.52 (1.46-4.34) respectivamente (Tabla 5).

Cuando se incluyeron cuatro variantes en el análisis se observaron IES para “*MTHFR-C677T*, *VDR-FokI*, *TCN2* y *ESR1-PvuII*” con una RM de 9.25 (IC 95% 4.94-17.31)  $p < 0.0001$ . Otras IES observadas fueron “*MTHFR-C677T*,

*ESR1-XbaI*, *TCN2* y *ESR1-PvuII*” con una RM 5.12 (IC95% 2.87-9.14)  $p < 0.0001$ . “*COL1A1*, *VDR-BsmI*, *MTHFR-C677T* y *ESR1-XbaI*” con una RM 3.4 (IC95% 1.94-5.98)  $p < 0.0001$ , “*COL1A1*, *VDR-FokI*, *ESR1-XbaI* y *TCN2*” RM 4.92 (IC 95% 2.76-8.78)  $p < 0.0001$  (Tabla 6).

La interacción de *MTHFR-C677T* con *VDR-FokI* mostró para las combinaciones genotípicas de alto riesgo una menor mediana de DMO de 0.576 gr/cm<sup>2</sup> comparada con la mediana de las combinaciones genotípicas de bajo riesgo de DMO 0.717 gr/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.028$ ) y de la misma manera para el resto de interacciones que mostraron DES (Figura 2).

De acuerdo con lo observado para las interacciones de riesgo entre “*MTHFR-C677T* y *VDR-FokI*”, a menores valores de DMO aumentaron las probabilidades de observar interacciones genotípicas de alto riesgo; y por el contrario, conforme los valores de DMO se incrementaban las probabilidades de observar interacciones de alto riesgo disminuyeron. Esta relación inversa y su efecto se incrementaron al incluir cuatro variantes en la interacción lo cual podría estar en relación con el efecto sinérgico entre ellas (Figura 3).

Mediante el análisis de entropía con el programa MDR se observó un efecto sinérgico entre las interacciones de *MTHFR-C677T*, *VDR-FokI*, *TCN2*, *ESR1-PvuII* y *COL1A1*. La interacción de cuatro variantes *MTHFR-C677T*, *VDR-FokI*, *TCN2* y *ESR1-PvuII* reportó los siguientes efectos marginales 1.7; 0.08; 0.7 y 0.55% respectivamente y un efecto sinérgico entre *MTHFR-C677T* y



*VDR-FokI*, entre *VDR-FokI* y *TCN2*, entre *TCN2* y *ESR1-PvuII* de 2.37, 3.61, 4.11% de entropía, respectivamente, (*Figura 4*).

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran diferentes interacciones genóticas entre variantes génicas de enzimas del metabolismo de los folatos, del receptor de vitamina D, del receptor de estrógenos tipo1 y del gen de la colágena tipo 1 alfa 1. Estas interacciones manifestaron efectos de magnitud variable sobre la DMO, lo cual sugiere cierta participación en el desarrollo de OPS en mujeres postmenopáusicas.

A pesar de una búsqueda sistemática de la literatura, a excepción de un par de estudios realizados en población caucásica de Estados Unidos (Xiong, 2006) y en población asiática de China (Huang, 2009), pero utilizando otros marcadores genéticos, no hemos encontrado a la fecha publicaciones de estudios similares con los cuales comparar nuestros resultados, sean estos de poblaciones iberoamericanas, caucásicas, afroamericanas o asiáticas.

Cabe señalar que ninguna de las variantes estudiadas mostraron un efecto significativo sobre los valores de DMO cuando fueron analizadas individualmente; lo cual podría ser atribuible al efecto muy moderado de cada una de las variantes. Sin embargo, a través del análisis de interacción gen-gen realizado, los resultados obtenidos han permitido la identificación de ciertas interacciones génicas entre las variantes génicas de los siguientes

genes *VDR* (*BsmI*, *FokI*, *ApaI*), *MTHFR*-C677T, *TCN2*, *ESR1* (*PvuII*, *XbaI*) y *COL1A1*.

Los diversos estudios realizados previamente del gen del *VDR* no han permitido hasta ahora atribuir un rol mayor a sus diferentes variantes en la regulación de la masa ósea (Ralston y Uitterlinden). Willing y cols. al estudiar el *VDR* y *ESR1* en 171 mujeres postmenopáusicas observaron que individuos con una combinación de genotipos “PP” del *ESR1-PvuII* y “bb” del *VDR-BsmI* tenían en promedio valores más altos de DMO en todos los sitios. Gennari y cols. en una población de mujeres postmenopáusicas en Italia, logró identificar grupos de individuos con altos y bajos valores de DMO para determinados haplotipos del *VDR* y *ESR1* (Gennari, 1998). Sin embargo, Vandevyver y cols. en una muestra de mujeres postmenopáusicas de Bélgica no encontraron interacción entre los genes mencionados (Vandevyver, 1999). En nuestro estudio observamos interacción entre las variantes del *VDR* y *ESR1* sólo cuando fueron incluidas en el análisis con cuatro variantes (*Tabla 5*).

El papel de determinadas variantes génicas de enzimas metabolizadoras de los folatos tiene un sustento biológico conocido a través del incremento en los valores de Hcy los cuales podrían explicar la inhibición de las uniones de colágena (Lubec, 1996), los defectos en la mineralización (Khan, 2001), la alteración en la función de osteoblastos (Kim, 2006; Sakamoto, 2005) y el incremento en la actividad de osteoclastos (Herrmann, 2005b). En nuestro estudio identificamos determinadas combinaciones genotípicas de *MTHFR* y

*TCN2* en interacción con variantes de *VDR*, *ESR1* y *COL1A1*. Existe evidencia de que ciertas variantes del *VDR* podrían afectar la absorción de cobalamina y como consecuencia alterar la regulación de la Hcy (Dhonukshe-Rutten, 2005); sin embargo, son necesarios más estudios que estudien el mecanismo biológico por el cual podrían interactuar estas variantes génicas.

Es interesante el hecho de que en el presente estudio *VDR* y *COL1A1* solo mostraron interacción cuando se analizaron en presencia de *MTHFR*, *ESR1* y *TCN2* (Tabla 5). Uitterlinden y cols. reportaron que la interacción entre determinados haplotipos de *VDR* y *COL1A1-Sp1* y riesgo para fracturas en las portadoras de los alelos de riesgo para ambos genes, tenían 4.4 veces más riesgo de fracturas comparado con el grupo de referencia (Uitterlinden, 2001).

Las interacciones génicas identificadas tienen efectos sobre los valores de DMO y pueden incrementar el riesgo para desarrollar osteoporosis. Así mismo, estos efectos podrían ser proporcionales a la presencia de determinadas variantes en interacción, lo cual es mostrado por el análisis de entropía. De esta forma, cada interacción podría manifestar determinada fuerza y dirección de su efecto, en sentido positivo (sinergia) o negativo (nulo). Lo anterior, sugiere que la variación en la DMO y el riesgo de OPS es un fenómeno complejo resultado de una extensa red de interacciones entre distintos genes y factores ambientales.

Este es el primer estudio que analiza la interacción génica en una muestra de la población mestiza mexicana, entre variantes relacionadas con el metabolismo de los folatos, del gen del *VDR*, del *ESR1* y de la *COL1A1* con el grado de DMO y riesgo para OPS. Si consideramos la etiología multifactorial de la enfermedad, estas interacciones podrían explicar una determinada fracción etiológica para el desarrollo de esta patología en mujeres postmenopáusicas. Consideramos conveniente realizar más estudios con el propósito de confirmar nuestros resultados y además identificar otras variantes genéticas propias de nuestra población que confieran riesgo para osteoporosis.

## TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1** Definición de Osteoporosis de acuerdo a los valores de DMO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido las siguientes definiciones basadas en la medición de la DMO en la columna, cadera y antebrazo mediante dispositivos DXA<sup>1</sup>:

**NORMAL**

DMO dentro de 1 DE<sup>2</sup> en un adulto “joven normal” (puntuación T entre -1 y +1)

**MASA ÓSEA DISMINUÍDA (“OSTEOPENIA”)**

DMO entre 1 y 2.5 DE por debajo de un adulto “joven normal” (puntuación T entre -1.0 y -2.5)

**OSTEOPOROSIS**

DMO por debajo de 2.5 DE o más en un adulto “joven normal” (puntuación T  $\leq$ -2.5).  
Pacientes en este grupo quienes han tenido una o más fracturas, son considerados como osteoporosis grave o “establecida”)

<sup>1</sup> DXA: Dual-energy x-ray absorptiometry

<sup>2</sup> DE: Desviación Estándar

**Tabla 2** Heredabilidad de osteoporosis y fenotipos relacionados

Fenotipo	Heredabilidad (H <sup>2</sup> , %)
Densidad Mineral Ósea	50-80%
Geometría De La Cadera	70-85%
Remodelamiento Óseo	40-70%
Microarquitectura Ósea	50-60%
Fracturas	25-48%

**Tabla 3** Características de las variantes génicas analizadas

GENES	CAMBIO	SNP	POSICIÓN GENÓMICA (PB)	POSICIÓN GÉNICA	CROMOSOMA	EHW * P
<i>VDR</i>						
<i>BsmI</i>	A>G	rs1544410	48,239,835	Intrón 8	12	1
<i>FokI</i>	T>C	rs2228570	48,272,895	Exón 2	12	0.81
<i>Apal</i>	G>T	rs7975232	48,238,837	Intrón 8	12	0.41
<i>TaqI</i>	T>C	rs731236	48,238,757	Exón 9	12	1
<i>MTHFR</i>						
C677T	C>T	rs1801133	11,856,378	Exón 5	1	0.21
A1298C	A>C	rs1801131	11,854,476	Exón 8	1	0.19
<i>MTR</i>	A>G	rs1805087	237,048,500	Exón 26	1	0.18
<i>MTRR</i>	A>G	rs1801394	7,870,973	Exón 2	5	0.71
<i>TCN2</i>	C>G	rs1801198	31,011,610	Exón 6	22	0.10
<i>ESR1</i>						
<i>XbaI</i>	A>G	rs9340799	152,163,381	Intrón 1	6	0.03
<i>PvuII</i>	T>C	rs2234693	152,163,335	Intrón 1	6	0.57
<i>COL1A1</i>	G>T	rs1107946	48,280,990	Intrón 1	17	0.35

\* EHW = Equilibrio de Hardy-Weinberg

**Tabla 4** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de enzimas del metabolismo de los folatos (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TCN2*), colágena tipo 1 alfa 1 (*COL1A1*), receptor de estrógenos tipo 1 (*ESR1*) y receptor de vitamina D (*VDR*)

PRIMER	SECUENCIA
<i>MTHFR</i>	S: 5'-GAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCT-3' AS: 5'-AAGGATGCCCATGTCCGGTGCATGCCT-3'
<i>MTR</i>	S: 5'-TGTTCCCAGCTGTTAGATGAAAATC-3' AS: 5'-GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC-3'
<i>MTRR</i>	S: 5'-CGCCCGGCCATCGCAGAAGACAT-3' AS: 5'-GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA-3'
<i>TCN2</i>	S: 5'-GTCAGGTGCTGGAACACCTAG-3' AS: 5'-TAGGTCTTGTGGTTCAGAACG-3'
<i>COL1A1</i>	
<i>COL1A1F</i>	S: 5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3'
<i>COL1A1-R-S</i>	AS-S: 5'-GTCCATCCCTCATCCCCGCCCC-3'
<i>COL1A1-R-M</i>	AS-M: 5'-GTCCATCCCTCATCCCCGCCCA-3'
<i>ESR1</i>	
<i>PvuII, XbaI</i>	S: 5'-GATATCCAGGGTTATGTGGCA-3' AS: 5'-AGGTGTTGCCTATTATATTAACCTTGA-3'
<i>VDR</i>	
<i>FokI</i>	S: 5'-GACTCTGGCTCTGACCGTGGC-3' AS: 5'-ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
<i>BsmI</i>	S: 5'-AGTGTGCAGGCGATTCGTAG-3' AS: 5'-AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG-3'
<i>ApaI, TaqI</i>	S: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' AS: 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'

S Sentido, AS Antisentido

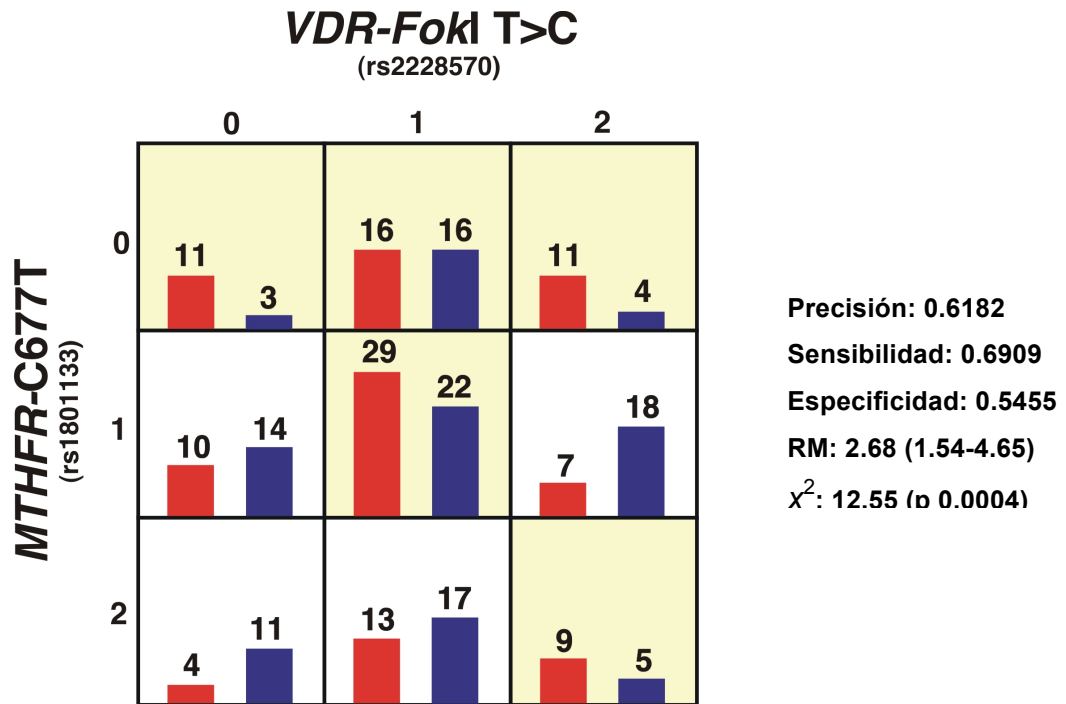
**Tabla 5** Resultados de la interacción gen-gen mediante MDR.

INTERACCIÓN	RM	IC95%	p
<i>MTHFR-C677T</i> <i>VDR-FokI</i>	2.68	(1.54-4.65)	0.0004
<i>TCN2</i> <i>VDR-ApaI</i>	2.52	(1.46-4.34)	0.0007
<i>TCN2</i> <i>ESR1-PvuII</i>	2.83	(1.64-4.90)	0.0002
<i>VDR-FokI</i> <i>TCN2</i>	2.52	(1.46-4.34)	0.0007

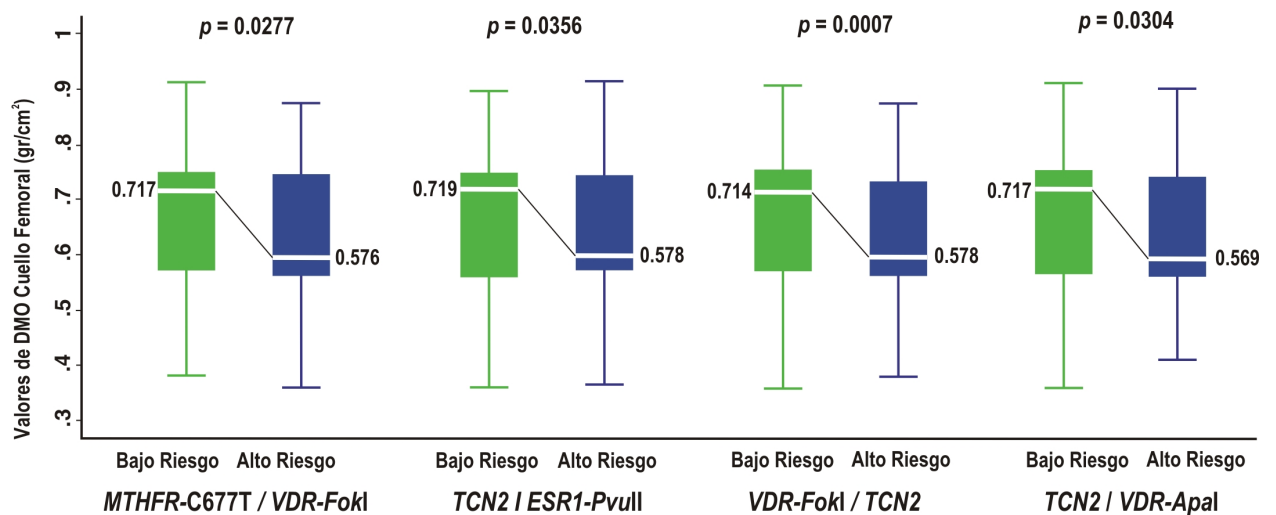
**Tabla 6** Resultados de la interacción con cuatro variantes génicas mediante el análisis por MDR.

INTERACCIONES	RM	IC(95%)	$\chi^2$	p
" <i>MTHFR-C677T</i> , <i>VDR-FokI</i> , <i>TCN2</i> y <i>ESR1-PvuII</i> "	9.25	4.94-17.31	54.1	<0.0001
" <i>MTHFR-C677T</i> , <i>ESR1-XbaI</i> , <i>TCN2</i> y <i>ESR1-PvuII</i> "	5.12	2.87-9.14	32.4	<0.0001
" <i>COL1A1</i> , <i>VDR-BsmI</i> , <i>MTHFR-</i> <i>C677T</i> y <i>ESR1-XbaI</i> "	3.4	1.94-5.98	19	<0.0001
" <i>COL1A1</i> , <i>VDR-FokI</i> , <i>ESR1-XbaI</i> y <i>TCN2</i> "	4.92	2.76-8.78	30.9	<0.0001

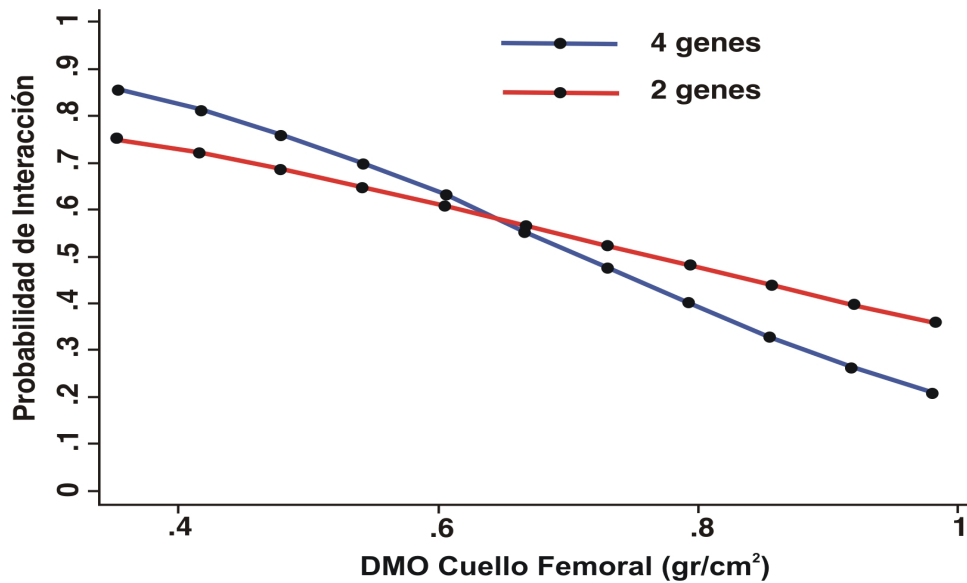




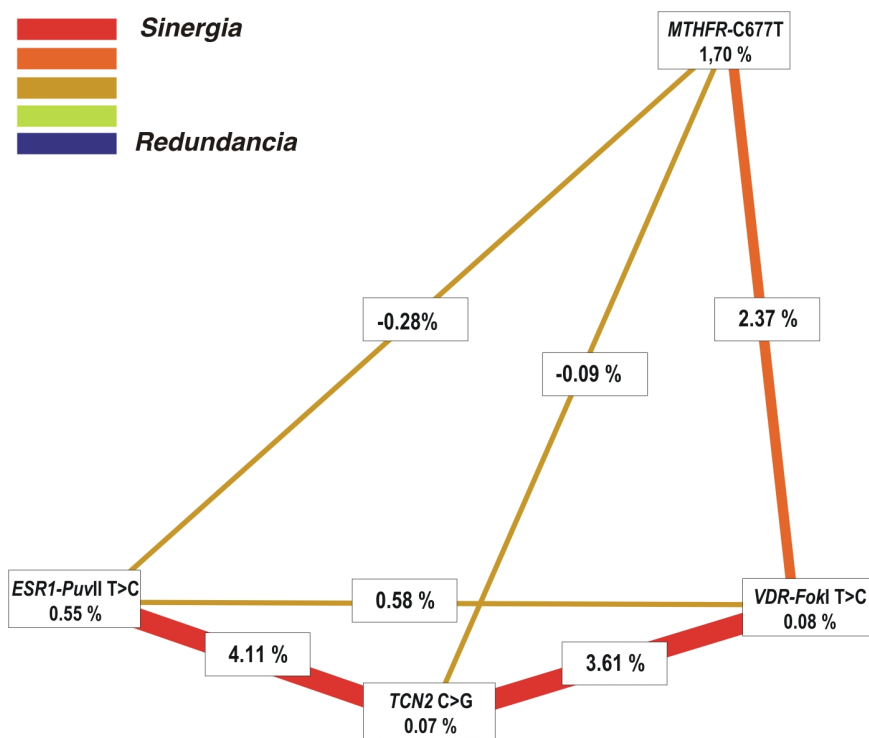
**Figura 1** Análisis de interacción mediante MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) con dos variantes genéticas “MTHFR-C677T y VDR-FokI T>C”. En amarillo claro las celdas de alto riesgo y en blanco las celdas de bajo riesgo. Cada celda contiene el número de casos (*barra roja*) y el número de controles (*barra azul*). Homocigoto silvestre (0), Heterocigoto (1) y Homocigoto mutante (2). A la derecha los valores resultado de la interacción.



**Figura 2** Diferencias en la DMO de cuello femoral. Diferencias en los valores de densidad mineral ósea ( $\log_{10}$ ) de acuerdo a genotipos de bajo riesgo (en verde) y alto riesgo (en azul) para las diferentes interacciones genéticas observadas con MDR.



**Figura 3** Probabilidad de interacción entre dos genes (*MTHFR-C677T* y *VDR-FokI*) y cuatro genes (*MTHFR-C677T*, *TCN2*, *VDR-FokI*, *ESR1-PvuII*) de acuerdo a los valores en la DMO. Probabilidad de observar efecto de interacción entre los genotipos de alto riesgo y bajo riesgo de acuerdo a los diferentes valores de la DMO en cuello femoral, p 0.01.



**Figura 4** Fuerza de interacción de cuatro variantes mediante el análisis de entropía con MDR.

Los porcentajes marginales para cada polimorfismo representan el efecto individual de los mismos. El porcentaje sobre las líneas que unen cada polimorfismo representa la magnitud del efecto conjunto, cuanto mayor el porcentaje mayor el efecto. El color de la línea indica el tipo de interacción, rojo y naranja sugieren epistasis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsen B, Jørgensen HL, Nielsen TL, Andersen M, Haug E, Schwarz P, Hagen C, Brixen K. 2006. MTHFR c.677C>T polymorphism as an independent predictor of peak bone mass in Danish men - Results from the Odense Androgen Study. *Bone* 38(2):215-219.
- Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, Stilgren L, Bladbjerg EM, Kristensen SR, Brixen K, Mosekilde L. 2003. A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *J Bone Miner Res* 18(4):723-9.
- Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, Stilgren L, Bladbjerg EM, Kristensen SR, Brixen K, Mosekilde L. 2005. Are effects of MTHFR (C677T) genotype on BMD confined to women with low folate and riboflavin intake? Analysis of food records from the Danish osteoporosis prevention study. *Bone* 36(3):577-83.
- Albagha OM, Pettersson U, Stewart A, McGuigan FE, MacDonald HM, Reid DM, Ralston SH. 2005. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet* 42(3):240-6.
- Baines M, Kredan MB, Usher J, Davison A, Higgins G, Taylor W, West C, Fraser WD, Ranganath LR. 2007. The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* 40(3):730-736.
- Barltrop D, Oppe TE. 1973. Calcium and fat absorption by low birthweight infants from a calcium-supplemented milk formula. *Arch Dis Child* 48(8):580-2.
- Barr R, Macdonald H, Stewart A, McGuigan F, Rogers A, Eastell R, Felsenberg D, Gluer C, Roux C, Reid DM. 2010. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms, falls, balance and muscle power: results from two independent studies (APOSS and OPUS). *Osteoporos Int* 21(3):457-66.
- Barri M, Abbas SK, Pickard DW, Hammonds RG, Wood WI, Caple IW, Martin TJ, Care AD. 1990. Fetal magnesium homeostasis in the sheep. *Exp Physiol* 75(5):681-8.
- Bathum L, Hjelmberg JVB, Christiansen L, Madsen JS, Skytthe A, Christensen K. 2004. Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporosis International* 15(8):659-664.
- Beil F, Seitz S, Priemel M, Barvencik F, von Domarus C, Rueger J, Amling M, Pogoda P. 2008. Pathophysiology and Pathomorphology of

- Osteoporosis. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* 34(6):527-534.
- Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. 1985. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endocrinol Metab* 61(5):969-75.
- Bonewald LF, Johnson ML. 2008. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42(4):606-615.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. 2008. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29(6):726-76.
- Brommage R, DeLuca HF. 1984. Placental transport of calcium and phosphorus is not regulated by vitamin D. *Am J Physiol* 246(4 Pt 2):F526-9.
- Bruns ME, Fausto A, Avioli LV. 1978. Placental calcium binding protein in rats. Apparent identity with vitamin D-dependent calcium binding protein from rat intestine. *J Biol Chem* 253(9):3186-90.
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. 2007. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 22(3):465-75.
- Care AD, Abbas SK, Pickard DW, Barri M, Drinkhill M, Findlay JB, White IR, Caple IW. 1990. Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol* 75(4):605-8.
- Cauley JA, Seeley DG, Ensrud K, Ettinger B, Black D, Cummings SR. 1995. Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 122(1):9-16.
- Clark P, Carlos F, Vázquez Martínez J. 2010. Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Archives of Osteoporosis* 5(1):9-17.
- Clark P, Cons-Molina F, Deleze M, Ragi S, Haddock L, Zanchetta JR, Jaller JJ, Palermo L, Talavera JO, Messina DO and others. 2009. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int* 20(2):275-82.
- Clark P, Lavielle P, Franco-Marina F, Ramirez E, Salmeron J, Kanis JA, Cummings SR. 2005. Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population-based study. *Osteoporos Int* 16(12):2025-30.
- Cooper C. 2005. Epidemiology of osteoporotic fracture: looking to the future. *Rheumatology* 44:36-40.
- Cortese C, Motti C. 2001. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition* 4(2 B):493-497.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. 2004. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20):7711-5.

- Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. 2010. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39(2):243-53, table of contents.
- Christakos S, Dhawan P, Shen Q, Peng X, Benn B, Zhong Y. 2006. New insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Ann N Y Acad Sci* 1068:194-203.
- Deleze M, Cons-Molina F, Villa AR, Morales-Torres J, Gonzalez-Gonzalez JG, Calva JJ, Murillo A, Briceno A, Orozco J, Morales-Franco G and others. 2000. Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporos Int* 11(7):562-9.
- Delorme AC, Danan JL, Ripoche MA, Mathieu H. 1982. Biochemical characterization of mouse vitamin D-dependent calcium-binding protein. Evidence for its presence in embryonic life. *Biochem J* 205(1):49-57.
- Devoto M, Specchia C, Li HH, Caminis J, Tenenhouse A, Rodriguez H, Spotila LD. 2001. Variance component linkage analysis indicates a QTL for femoral neck bone mineral density on chromosome 1p36. *Human Molecular Genetics* 10(21):2447-2452.
- Dhawan P, Peng X, Sutton AL, MacDonald PN, Croniger CM, Trautwein C, Centrella M, McCarthy TL, Christakos S. 2005. Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 25(1):472-87.
- Dhonukshe-Rutten RA, van Dusseldorp M, Schneede J, de Groot LC, van Staveren WA. 2005. Low bone mineral density and bone mineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *Eur J Nutr* 44(6):341-7.
- Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, Wark JD. 1996. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9):3366-71.
- Elliott JO, Jacobson MP, Haneef Z. 2007. Homocysteine and bone loss in epilepsy. *Seizure* 16(1):22-34.
- Falcon-Ramirez E, Casas-Avila L, Miranda A, Diez P, Castro C, Rubio J, Gomez R, Valdes-Flores M. 2011. Sp1 polymorphism in collagen I alpha1 gene is associated with osteoporosis in lumbar spine of Mexican women. *Mol Biol Rep* 38(5):2987-92.
- Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA and others. 2005. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 77(5):807-23.
- Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW, Anderson JJ. 1993. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N Engl J Med* 329(16):1141-6.

- Ferrari S. 2008. Human genetics of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(5):723-35.
- Ferrari S, Ringe J. 2009. Pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. In: Rizzoli R, editor. *Atlas of Postmenopausal Osteoporosis*. 3th ed: Springer Healthcare Ltd. p 1-32.
- Fleisch H. 1997. Bone and mineral metabolism. Bisphosphonates in bone disease : from the laboratory to the patient. 3rd ed. New York: Parthenon. p 11-31.
- Genant HK, Lang TF, Engelke K, Fuerst T, Gluer C, Majumdar S, Jergas M. 1996. Advances in the noninvasive assessment of bone density, quality, and structure. *Calcif Tissue Int* 59 Suppl 1:S10-5.
- Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi AM and others. 1998. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3):939-44.
- Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A, Pettersson K, Väänänen HK, Obrant KJ, Åkesson K. 2007. Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(1):127-134.
- Giguere Y, Rousseau F. 2000. The genetics of osteoporosis: 'complexities and difficulties'. *Clin Genet* 57(3):161-9.
- Giles MM, Fenton MH, Shaw B, Elton RA, Clarke M, Lang M, Hume R. 1987. Sequential calcium and phosphorus balance studies in preterm infants. *J Pediatr* 110(4):591-8.
- Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Drevon CA, Gjessing HK, Tell GS. 2006. Plasma total homocysteine level and bone mineral density: The Hordaland Homocysteine Study. *Archives of Internal Medicine* 166(1):88-94.
- Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Meyer HE, Tell GS. 2007. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 and the risk of hip fracture: The hordaland homocysteine study. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(5):747-756.
- Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA and others. 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8(5):751-64.
- Glazier JD, Atkinson DE, Thornburg KL, Sharpe PT, Edwards D, Boyd RD, Sibley CP. 1992. Gestational changes in Ca<sup>2+</sup> transport across rat placenta and mRNA for calbindin9K and Ca(2+)-ATPase. *Am J Physiol* 263(4 Pt 2):R930-5.
- Gogakos AI, Cheung MS, Bassett JD, Williams GR. 2009. Bone signaling pathways and treatment of osteoporosis. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 4(6):639-650.

- Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, Omrani GR. 2004. Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: A cross-sectional study. *Bone* 35(3):760-765.
- Gomez R, Magana JJ, Cisneros B, Perez-Salazar E, Faugeron S, Veliz D, Castro C, Rubio J, Casas L, Valdes-Flores M. 2007. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population. *Clin Genet* 72(6):574-81.
- Haddad JG, Jr., Boisseau V, Avioli LV. 1971. Placental transfer of vitamin D3 and 25-hydroxycholecalciferol in the rat. *J Lab Clin Med* 77(6):908-15.
- Halloran BP, De Luca HF. 1981. Effect of vitamin D deficiency on skeletal development during early growth in the rat. *Arch Biochem Biophys* 209(1):7-14.
- Henry HL, Norman AW. 1984. Vitamin D: metabolism and biological actions. *Annu Rev Nutr* 4:493-520.
- Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, Meyers DA and others. 2002. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 105(16):1879-82.
- Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W. 2005a. Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 43(10):1118-1123.
- Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al Marrawi F, Widmann T, Zallone A, Wildemann B, Herrmann W. 2007a. Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone* 41(4):584-591.
- Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W. 2005b. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem* 51(12):2348-53.
- Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O, Hübner U, Pexa A, Umanskaya N, Herrmann W. 2007b. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clinical Chemistry* 53(8):1455-1461.
- Hong X, Hsu YH, Terwedow H, Tang G, Liu X, Jiang S, Xu X, Xu X. 2007. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and fracture risk in Chinese postmenopausal women. *Bone* 40(3):737-742.
- Hosoi T. 2010. Genetic aspects of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 28(6):601-7.
- Huang QY, Li GH, Kung AW. 2009. Multiple osteoporosis susceptibility genes on chromosome 1p36 in Chinese. *Bone* 44(5):984-8.

- Husain SM, Birdsey TJ, Glazier JD, Mughal MZ, Garland HO, Sibley CP. 1994. Effect of diabetes mellitus on maternofetal flux of calcium and magnesium and calbindin9K mRNA expression in rat placenta. *Pediatr Res* 35(3):376-81.
- Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, van't Hof RJ, Ralston SH. 2009. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab* 10(2):139-47.
- Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH. 2005. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med* 11(7):774-9.
- Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S and others. 2004. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 292(17):2105-14.
- Ioannidis JP, Stavrou I, Trikalinos TA, Zois C, Brandi ML, Gennari L, Albagha O, Ralston SH, Tsatsoulis A. 2002. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. *J Bone Miner Res* 17(11):2048-60.
- Jackson SH. 1973. The reaction of homocysteine with aldehyde: an explanation of the collagen defects in homocystinuria. *Clinica Chimica Acta* 45(3):215-217.
- Jaramillo-Rangel G, Cerda-Flores RM, Cardenas-Ibarra L, Tamayo-Orozco J, Morrison N, Barrera-Saldana HA. 1999. Vitamin D receptor polymorphisms and bone mineral density in Mexican women without osteoporosis. *American Journal of Human Biology* 11(6):793-797.
- Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Van Hul W. 2004. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J Bone Miner Res* 19(11):1749-57.
- Kanis J. 1994a. Pathogenesis of osteoporosis and fracture. *Osteoporosis*. Oxford ; Cambridge, Mass.: Blackwell Science. p 22-55.
- Kanis JA. 1994b. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4(6):368-81.
- Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R. 2008. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19(4):399-428.
- Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. 2000. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone* 27(5):585-90.
- Khan M, Yamauchi M, Srisawasdi S, Stiner D, Doty S, Paschalis EP, Boskey AL. 2001. Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix



- mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone* 28(4):387-98.
- Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS. 2006. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39(3):582-90.
- Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Sato T, Okumura K, Nogami M, Hasegawa Y, Niimi H, Yanagisawa J, Tanaka T and others. 1998. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med* 338(10):653-61.
- Kobayashi A, Kawai S, Obe Y, Nagashima Y. 1975. Effects of dietary lactose and lactase preparation on the intestinal absorption of calcium and magnesium in normal infants. *Am J Clin Nutr* 28(7):681-3.
- Kocian J, Skala I, Bakos K. 1973. Calcium absorption from milk and lactose-free milk in healthy subjects and patients with lactose intolerance. *Digestion* 9(4):317-24.
- Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, Kim GS. 2006. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *Journal of Bone and Mineral Research* 21(7):1003-1011.
- Korach KS. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 266(5190):1524-7.
- Kovacs CS. 2011. Bone development in the fetus and neonate: role of the calciotropic hormones. *Curr Osteoporos Rep* 9(4):274-83.
- Kovacs CS, Chafe LL, Fudge NJ, Friel JK, Manley NR. 2001a. PTH regulates fetal blood calcium and skeletal mineralization independently of PTHrP. *Endocrinology* 142(11):4983-93.
- Kovacs CS, Ho-Pao CL, Hunzelman JL, Lanske B, Fox J, Seidman JG, Seidman CE, Kronenberg HM. 1998. Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest* 101(12):2812-20.
- Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM. 1996. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26):15233-8.
- Kovacs CS, Manley NR, Moseley JM, Martin TJ, Kronenberg HM. 2001b. Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport. *J Clin Invest* 107(8):1007-15.
- Kovacs CS, Woodland ML, Fudge NJ, Friel JK. 2005. The vitamin D receptor is not required for fetal mineral homeostasis or for the regulation of placental calcium transfer in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(1):E133-44.
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116(5):1202-9.

- Kuo HK, Liao KC, Leveille SG, Bean JF, Yen CJ, Chen JH, Yu YH, Tai TY. 2007. Relationship of homocysteine levels to quadriceps strength, gait speed, and late-life disability in older adults. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 62(4):434-439.
- Lachenmaier-Currie U, Harmeyer J. 1989. Placental transport of calcium and phosphorus in pigs. *J Perinat Med* 17(2):127-36.
- Lai BM, Cheung CL, Luk KD, Kung AW. 2008. Estrogen receptor alpha CA dinucleotide repeat polymorphism is associated with rate of bone loss in perimenopausal women and bone mineral density and risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19(4):571-9.
- Lavra\*c N. 2003. Knowledge discovery in databases: PKDD 2003 : 7th European Conference on Principles and Practice of Knowledge Discovery in Databases, Cavtat-Dubronik, Croatia, September 22-26, 2003 : proceedings. Berlin ; New York: Springer. xvi, 508 p. p.
- Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. 2003. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature* 424(6947):389.
- Levasseur R. 2009. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine* 76(3):234-40.
- Li WF, Hou SX, Yu B, Li MM, Ferec C, Chen JM. 2010. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet* 127(3):249-85.
- Lisker R, Lopez MA, Jasqui S, Ponce De Leon Rosales S, Correa-Rotter R, Sanchez S, Mutchinick OM. 2003. Association of vitamin D receptor polymorphisms with osteoporosis in mexican postmenopausal women. *Hum Biol* 75(3):399-403.
- Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR, Deng HW. 2006. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res* 21(10):1511-35.
- Loughead JL, Mimouni F, Tsang RC. 1988. Serum ionized calcium concentrations in normal neonates. *Am J Dis Child* 142(5):516-8.
- Lu Y, Genant HK, Shepherd J, Zhao S, Mathur A, Fuerst TP, Cummings SR. 2001. Classification of osteoporosis based on bone mineral densities. *J Bone Miner Res* 16(5):901-10.
- Lubec B, Fang-Kircher S, Lubec T, Blom HJ, Boers GH. 1996. Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim Biophys Acta* 1315(3):159-62.
- Macdonald HM, McGuigan FE, Fraser WD, New SA, Ralston SH, Reid DM. 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interacts with riboflavin intake to influence bone mineral density. *Bone* 35(4):957-64.
- Maggi S, Kelsey JL, Litvak J, Heyse SP. 1991. Incidence of hip fractures in the elderly: a cross-national analysis. *Osteoporos Int* 1(4):232-41.

- Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH. 2001. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 107(7):899-907.
- Marcus R, Feldman D, Kelsey J. 1996. The bone organ system: from and function. *Osteoporosis*. San Diego, C.A.: Academic Press. p 3-22.
- Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, Arai H, Yasuda M, Tanaka C, Emson PC and others. 2000. Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57(2):236-40.
- Massé PG, Boskey AL, Ziv I, Hauschka P, Donovan SM, Howell DS, Cole DE. 2003. Chemical and biomechanical characterization of hyperhomocysteinemic bone disease in an animal model. *BMC musculoskeletal disorders [electronic resource]* 4(1):2.
- McDonald KR, Fudge NJ, Woodrow JP, Friel JK, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. 2004. Ablation of calcitonin/calcitonin gene-related peptide-alpha impairs fetal magnesium but not calcium homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(2):E218-26.
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. 2004. Homocysteine as a Predictive Factor for Hip Fracture in Older Persons. *New England Journal of Medicine* 350(20):2042-2049.
- Miller SC, Halloran BP, DeLuca HF, Jee WS. 1983. Studies on the role of vitamin D in early skeletal development, mineralization, and growth in rats. *Calcif Tissue Int* 35(4-5):455-60.
- Miyao M, Morita H, Hosoi T, Kurihara H, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Yazaki Y, Ouchi Y. 2000. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int* 66(3):190-4.
- Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G and others. 2007. Association of the VDR translation start site polymorphism and fracture risk in older women. *J Bone Miner Res* 22(5):730-6.
- Moore JH. 2004. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 4(6):795-803.
- Moore KL, Persaud TVN. 1998. *The developing human : clinically oriented embryology*. Philadelphia: Saunders. xii, 563 p. p.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. 1994. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367(6460):284-7.
- Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. 2005. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for

- the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 19(9):1093-104.
- NAMS. 2010. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 17(1):25-54; quiz 55-6.
- National-Osteoporosis-Foundation. 2010. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis.: Washington, DC: National Osteoporosis Foundation.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. 1999. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 96(4):507-15.
- Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E and others. 2006. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3):696-701.
- Omdahl JL, Morris HA, May BK. 2002. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22:139-66.
- Onder G, Capoluongo E, Danese P, Settanni S, Russo A, Concolino P, Bernabei R, Landi F. 2008. Vitamin D receptor polymorphisms and falls among older adults living in the community: results from the iSIRENTE study. *J Bone Miner Res* 23(7):1031-6.
- Ortiz Z, Shea B, Suarez Almazor M, Moher D, Wells G, Tugwell P. 2000. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane database of systematic reviews (Online : Update Software)*(2).
- Parfitt AM. 1992. The physiologic and pathogenetic significance of bone histomorphometric data. In: Coe FL, Flavus MJ, editors. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York, NY: Raven Press. p 475-489.
- Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. 1995. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 10(3):466-73.
- Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. 2002. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 23(3):303-26.
- Périer MA, Gineyts E, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. 2007. Homocysteine and fracture risk in postmenopausal women: The OFELY study. *Osteoporosis International* 18(10):1329-1336.
- Pierce JR. 2003. *An Introduction to Information Theory, Symbols, Signals and Noise*.
- Pike JW, Meyer MB. 2010. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol Metab Clin North Am* 39(2):255-69, table of contents.

- Pope FM, Nicholls AC, McPheat J, Talmud P, Owen R. 1985. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 22(6):466-78.
- Prestwood KM, Kenny AM, Kleppinger A, Kulldorff M. 2003. Ultralow-dose micronized 17beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 290(8):1042-8.
- Prestwood KM, Kenny AM, Unson C, Kulldorff M. 2000. The effect of low dose micronized 17ss-estradiol on bone turnover, sex hormone levels, and side effects in older women: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4462-9.
- Prosser DE, Jones G. 2004. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 29(12):664-73.
- Ralston SH, de Crombrughe B. 2006. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 20(18):2492-506.
- Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of Osteoporosis. *Endocr Rev*.
- Ralston SH, Uitterlinden AG. 2010. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 31(5):629-62.
- Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M and others. 2006. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med* 3(4):e90.
- Rauch F, Travers R, Glorieux FH. 2006. Cellular activity on the seven surfaces of iliac bone: a histomorphometric study in children and adolescents. *J Bone Miner Res* 21(4):513-9.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Servadei L, Martelli M, Brunetti N, Bastagli L, Cucinotta D, Mariani E. 2005. Folate, but not homocysteine, predicts the risk of fracture in elderly persons. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 60(11):1458-1462.
- Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygård O, Vollset SE. 2006. The Hordaland Homocysteine Study: A community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *Journal of Nutrition* 136(6):1731S-1740S.
- Riancho JA, Valero C, Zarrabeitia MT. 2006. MTHFR polymorphism and bone mineral density: meta-analysis of published studies. *Calcif Tissue Int* 79(5):289-93.
- Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, Zillikens MC, Kavvoura FK, Amin N, Aulchenko YS and others. 2009. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 41(11):1199-206.
- Robert K, Maurin N, Vayssettes C, Siauve N, Janel N. 2005. Cystathionine  $\beta$  synthase deficiency affects mouse endochondral ossification.

- Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology 282(1):1-7.
- Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B. 2007. Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 25(7):797-804.
- Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE and others. 2008. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 283(9):5866-75.
- Rodan S, Duong T. 2008. Cathepsin K. A New Molecular Target for Osteoporosis. *BoneKey* 5:16-24.
- Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, Liebhaber SA, Cooke NE. 1999. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 103(2):239-51.
- Saito M, Fujii K, Marumo K. 2006. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcified Tissue International* 79(3):160-168.
- Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H. 2005. Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1740(1):12-6.
- Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. 2005a. Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 293(9):1082-1088.
- Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. 2005b. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in stroke patients. *Bone* 36(4):721-726.
- Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. 2005c. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in elderly women with Parkinson's disease. *American Journal of Medicine* 118(11):1250-1255.
- Seeman E. 2002. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359(9320):1841-1850.
- Seeman E, Delmas PD. 2006. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354(21):2250-61.
- Seki K, Furuya K, Makimura N, Mitsui C, Hirata J, Nagata I. 1994. Cord blood levels of calcium-regulating hormones and osteocalcin in premature infants. *J Perinat Med* 22(3):189-94.
- Selhub J. 2006. The many facets of hyperhomocysteinemia: Studies from the framingham cohorts. *Journal of Nutrition* 136(6):1726S-1730S.
- Senterre J, Salle B. 1982. Calcium and phosphorus economy of the preterm infant and its interaction with vitamin D and its metabolites. *Acta Paediatr Scand Suppl* 296:85-92.

- Shaw JC. 1976. Evidence for defective skeletal mineralization in low-birthweight infants: the absorption of calcium and fat. *Pediatrics* 57(1):16-25.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. 2001. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6500-5.
- Simmonds CS, Karsenty G, Karaplis AC, Kovacs CS. 2010. Parathyroid hormone regulates fetal-placental mineral homeostasis. *J Bone Miner Res* 25(3):594-605.
- Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, Gaillard-Kelly M, Baron R. 2002. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* 30(1):18-25.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331(16):1056-61.
- St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, Barletta F, Raval-Pandya M, Chapin K, Depovere J, Mathieu C, Christakos S, Demay MB and others. 2000. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 141(7):2658-66.
- Stewart TL, Roschger P, Misof BM, Mann V, Fratzl P, Klaushofer K, Aspden R, Ralston SH. 2005. Association of COLIA1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization in vivo. *Calcif Tissue Int* 77(2):113-8.
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV and others. 2008. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 358(22):2355-65.
- Sutton AL, MacDonald PN. 2003. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 17(5):777-91.
- Takaiwa M, Aya K, Miyai T, Hasegawa K, Yokoyama M, Kondo Y, Kodani N, Seino Y, Tanaka H, Morishima T. 2010. Fibroblast growth factor 23 concentrations in healthy term infants during the early postpartum period. *Bone* 47(2):256-262.
- Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111(3):305-17.
- The ADHR Consortium. 2000. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 26(3):345-8.

- Trotter M, Hixon BB. 1974. Sequential changes in weight, density, and percentage ash weight of human skeletons from an early fetal period through old age. *Anat Rec* 179(1):1-18.
- Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J and others. 2006. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 145(4):255-64.
- Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. 2001. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type I alpha1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res* 16(2):379-85.
- Valero C, Alonso MA, Zarrabeitia MT, Viadero C, Hernandez JL, Riancho JA. 2007. MTHFR C677T polymorphism and osteoporotic fractures. *Horm Metab Res* 39(8):543-7.
- van't Hof RJ, Macphée J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH. 2004. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology* 145(11):5068-74.
- Van Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, Boers GHJ, Haagsma CJ, Thomas CMG, De Boo TM, Van De Putte LBA. 2002. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41(6):658-665.
- Van Meurs JBJ, Dhonukshe-Rutten RAM, Pluijm SMF, Van Der Klift M, De Jonge R, Lindemans J, De Groot LCPGM, Hofman A, Witteman JCM, Van Leeuwen JPTM and others. 2004. Homocysteine Levels and the Risk of Osteoporotic Fracture. *New England Journal of Medicine* 350(20):2033-2041+2113.
- Vandevyver C, Vanhoof J, Declerck K, Stinissen P, Vandervorst C, Michiels L, Cassiman JJ, Boonen S, Raus J, Geusens P. 1999. Lack of association between estrogen receptor genotypes and bone mineral density, fracture history, or muscle strength in elderly women. *J Bone Miner Res* 14(9):1576-82.
- Verhagen AM, Rabelink TJ, Braam B, Opgenorth TJ, Grone HJ, Koomans HA, Joles JA. 1998. Endothelin A receptor blockade alleviates hypertension and renal lesions associated with chronic nitric oxide synthase inhibition. *J Am Soc Nephrol* 9(5):755-62.
- Viljakainen HT, Saarnio E, Hytinantti T, Miettinen M, Surcel H, Makitie O, Andersson S, Laitinen K, Lamberg-Allardt C. 2010. Maternal vitamin D status determines bone variables in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1749-57.
- Villadsen MM, Bunger MH, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL. 2005. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporosis International* 16(4):411-416.



- Wang CL, Tang XY, Chen WQ, Su YX, Zhang CX, Chen YM. 2007. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18(3):295-305.
- Wang H, Liu C. 2011. Association of MTHFR C667T polymorphism with bone mineral density and fracture risk: an updated meta-analysis. *Osteoporos Int*.
- Wang JT, Guo Y, Yang TL, Xu XH, Dong SS, Li M, Li TQ, Chen Y, Deng HW. 2008. Polymorphisms in the estrogen receptor genes are associated with hip fractures in Chinese. *Bone* 43(5):910-4.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N. 1995. Mice deficient in cystathionine  $\beta$ -synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(5):1585-1589.
- Webb AR, Kline L, Holick MF. 1988. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 67(2):373-8.
- Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. 2003. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res* 18(7):1227-34.
- White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ. 2001. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int* 60(6):2079-86.
- Willing M, Sowers M, Aron D, Clark MK, Burns T, Bunten C, Crutchfield M, D'Agostino D, Jannausch M. 1998. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 13(4):695-705.
- Windahl SH, Hollberg K, Vidal O, Gustafsson JA, Ohlsson C, Andersson G. 2001. Female estrogen receptor beta-/- mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res* 16(8):1388-98.
- Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR and others. 2006. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res* 21(11):1678-95.
- Xu XH, Dong SS, Guo Y, Yang TL, Lei SF, Papasian CJ, Zhao M, Deng HW. 2010. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev* 31(4):447-505.
- Yang Y. 2009. Skeletal morphogenesis during embryonic development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19(3):197-218.

- Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, Cooke NE, Pike JW. 2008. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology* 149(7):3656-67.
- Zierold C, Nehring JA, DeLuca HF. 2007. Nuclear receptor 4A2 and C/EBPbeta regulate the parathyroid hormone-mediated transcriptional regulation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 460(2):233-9.