

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN:

***Genética Médica***

Análisis de polimorfismo de nucleótido sencillo en genes relacionados al metabolismo óseo en pacientes mexicanas posmenopáusicas con fractura de cadera secundaria a osteoporosis

**T E S I S**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

***Genética Médica***

**P R E S E N T A:**

*María Cristina Hernández Medrano*

PROFESOR TITULAR

*Dra. Margarita Valdés Flores*

ASESOR

*Dr. Alberto Hidalgo Bravo*

Ciudad de México

Febrero 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

**DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL**  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD

---

**DRA. XOCHIQUETZAL HERNANDEZ LOPEZ**  
SUBDIRECTORA DE EDUCACION MEDICA

---

**DR. ROGELIO SANDOVAL VEGA GIL**  
JEFE DEL SERVICIO DE EDUCACION MEDICA

---

**DRA. MARGARITA VALDES FLORES**

PROFESOR TITULAR

---

**DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**

ASESOR METODOLOGICO



## AGRADECIMIENTOS



## ÍNDICE

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	10
3. Planteamiento del problema.....	34
4. Justificación.....	36
5. Objetivo.....	37
6. Material y métodos	
a. Diseño del estudio.....	38
b. Población de estudio.....	38
c. Criterios de inclusión y exclusión.....	38
d. Extracción de DNA.....	40
e. Genotipificación.....	43
7. Análisis estadístico.....	48
8. Resultados.....	49
9. Discusión.....	61
10. Bibliografía.....	68

## 1. Resumen

La osteoporosis (OP) es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por disminución de la densidad mineral ósea y representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Afecta mayormente a mujeres en edad posmenopáusica, debido, principalmente, a los cambios hormonales propios de esa etapa de la vida. Actualmente, los costos de la enfermedad y sus complicaciones tienen un alto impacto en los servicios de salud requiriendo mayores atenciones y presupuesto para su resolución.

La OP predispone a fracturas por fragilidad ósea. Las fracturas de cadera son la consecuencia más seria de la OP y las más frecuentes junto con las de radio distal y cuerpos vertebrales. Se estima que una de cada 12 mujeres y uno de cada veinte hombres presentarán una fractura de cadera después de los 50 años. Se ha demostrado que la OP tiene un importante componente genético dependiendo de la población estudiada gracias a la identificación de múltiples genes asociados en el remodelado óseo

En años recientes se han buscado marcadores biológicos que ayuden a identificar a la población en riesgo. En otras poblaciones se han logrado identificar polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs por sus siglas en inglés) asociados con el riesgo de tener OP y/o de padecer fractura de cadera. Sin embargo, debido a las diferencias genéticas entre poblaciones no se puede generalizar el uso de dichas variantes genéticas a nivel mundial. Es necesario investigar cómo se comportan los SNPs en población mexicana y determinar si se asocian a la enfermedad y/o a la fractura de cadera. El objetivo de este estudio es establecer si hay SNPs en genes relacionados al metabolismo óseo que pudieran estar asociados a fracturas de cadera en pacientes post menopáusicas con diagnóstico de osteoporosis. Este conocimiento ayudará a detectar a la población en riesgo antes de presentar fracturas, reduciendo así los costos en los servicios de salud y mejorando la calidad de vida de los afectados.

Palabras clave: osteoporosis, fracturas, enfermedad crónico-degenerativa, polimorfismos.

## 2. Introducción

Los seres humanos estamos formados de diversos aparatos y sistemas, los cuales poseen características tanto anatómicas, fisiológicas e histológicas diferentes. En este trabajo nos enfocaremos en el sistema óseo y su principal enfermedad, la osteoporosis (OP). Este sistema, en conjunto con el sistema articular y muscular conforman el aparato locomotor. Su principal función es dar estructura y soporte al organismo, y está formado de aproximadamente 206 huesos (Buck II & Dumanian, 2012).

Los huesos son tejido conectivo, metabólicamente activo, el cual provee soporte y anclaje para los músculos, cumpliendo con la función del movimiento. Funciona como reserva de minerales y factores de crecimiento, está involucrado en la hematopoyesis y en el mantenimiento del equilibrio ácido-base (Buck II & Dumanian, 2012) (Li, Quanwei, Sixu, Huayu, & al, 2016).

El hueso se deriva de tejido mesodérmico. En los fetos, se conforma de dos maneras: osificación endocondral u osificación endomembranosa. La primera tiene como característica que la formación de hueso es mediante tejido

cartilaginoso iniciado por la proliferación de condrocitos y es el proceso mediante el cual los huesos crecen a lo largo. Mientras que el segundo tipo de osificación, no se requiere el cartílago como intermediario, es característico de los huesos planos y de la cicatrización del hueso primario. Ocurre con el espontáneo desarrollo de un centro de osificación dentro de la matriz extracelular por la diferenciación de células madre en células osteoprogenitoras. Estos tipos de formación, reflejan en el adulto los tipos de curación ósea

En general, el esqueleto de un adulto maduro se compone de hueso cortical y trabecular. Los primeros representan el 80% de la masa ósea del esqueleto, aporta soporte y la dureza del mismo, posee una porosidad entre el 5- 10% lo cual le proporciona máxima resistencia a la torsión y aporta la fuerza (Buck II & Dumanian, 2012). El segundo tipo es metabólicamente más activo, posee una porosidad de 50- 90% y responde de manera más eficiente a las alteraciones hormonales debido a una mayor relación superficie- volumen y a tener las células óseas primarias en la superficie. Su principal función es permitir cierto grado de deformación y absorción de carga, se ha visto que suele ser más sensible ante

los cambios producidos por la OP (Lieben, Callewaert, & Roger, 2009) (Zanker & Duque, 2018).

Dentro de la composición del hueso, la matriz consiste el 90% de su peso. Se forma a partir de compuestos orgánicos e inorgánicos. Los primeros se dividen en 90% colágeno y 10% proteínas no colágenas que constituyen la matriz ósea y los segundos son compuestos inorgánicos como cristales de fosfato de calcio (Zanker & Duque, 2018). Los dos tipos de hueso tienen mecanismos de remodelación aun no del todo dilucidados, pero mantienen el balance en el microambiente. (Lieben, Callewaert, & Roger, 2009)

La homeostasis ósea se mantiene a lo largo de la vida mediante el equilibrio entre la formación de hueso por los osteoblastos, provenientes de las células mesenquimales, y la reabsorción por los osteoclastos, de origen hematopoyético (Zanker & Duque, 2018). Y es regulada por los osteocitos, que provienen de los osteoblastos. Al perderse este balance, hay una mayor resorción ósea por lo que la degradación del hueso se lleva de manera más continua (Lieben, Callewaert, & Roger, 2009).

En la etapa adulta, la falta de equilibrio puede conducir a enfermedades esqueléticas, como la osteoporosis (Gori, Lerner, Ohlsson, & Baron, 2015). La osteoporosis (OP) es una enfermedad sistémica que se caracteriza por presentar deterioro de la masa ósea y la microarquitectura de la misma, junto con un aumento de la fragilidad, que predispone a los huesos a fracturarse ante traumatismo de baja energía (Black & Cooper, 2000). Las fracturas ocurren principalmente en cadera, columna y radio distal (Valdés-Flores, Casas-Ávila, Falcón-Ramírez, & Ponce-de-León-Suárez, 2012).

La densidad mineral ósea (DMO) es la medida de la cantidad de minerales que posee cierto volumen de hueso, se expresa en  $\text{gr/cm}^2$  y se utiliza tanto para diagnosticar enfermedades como la OP, así como para medir la respuesta al tratamiento. Es el factor predictivo más importante para las fracturas (Ibáñez, 2003).

El pico máximo de DMO se obtiene entre la tercera y cuarta década de la vida (Koller, Zheng, Karasik, & Yerges-Armstrong, 2013). Posteriormente, el 10% del hueso es remodelado cada año, al alterarse su homeostasis la DMO disminuye progresivamente ocasionando microtrauma a la

microarquitectura ósea. Este proceso de remodelamiento se encuentra regulado por diversas vías metabólicas (Hendrickx, Boudin, & Van Hul, A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la OP como el quinto problema de salud pública a nivel mundial, así como una enfermedad silenciosa, ya que la principal manifestación suelen ser las fracturas. Actualmente, ocurren 1.5 millones de fracturas cada año secundarias a OP en Estados Unidos, la mayoría en mujeres en edad post menopáusica (Hendrickx, Boudin, & Van Hul, A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis, 2015). En México, el 16% de las mujeres tienen diagnóstico de osteoporosis, con lo cual se puede estimar que una de cada 12 tendrán una fractura a lo largo de su vida (Colles, 1970) (Rosales-Aujang, Muñoz-Enciso, & Arias-Ulloa, 2014) (Hidalgo-Bravo, Parra-Torres, Casas-Avila, & Jimenez-Ortega, 2018). Ante la presentación de la primera fractura secundaria a OP, el riesgo de presentar una segunda varía entre el 50 y 100% (Hidalgo-Bravo, Parra-Torres, Casas-Avila, & Jimenez-Ortega, 2018) (Colles, 1970).

En el 2005, se estimó que los cuidados directos para las fracturas secundarias a OP, incluyendo visitas médicas, admisiones hospitalarias y a centros de cuidado especializados, fue de \$19 miles de millones de dólares solo en Estados Unidos (Hendrickx, Boudin, & Van Hul, A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis, 2015). Dado que la pirámide poblacional se está invirtiendo (Figura 1), se cree que esta cifra aumentará a \$25.3 miles de millones de dólares en el 2025 (Rosales-Aujang, Muñoz-Enciso, & Arias-Ulloa, 2014). Según la Fundación Internacional de Osteoporosis, en 2005 se registraron 21 mil casos de fractura de cadera secundaria a OP y el costo directo de las mismas en 2006 se estimó en más de \$97 miles de millones de dólares a nivel internacional. Los costos en los servicios de salud de la OP en la Unión Europea se estimaron en €31.7 miles de millones de euros en el año 2000, y se prevé que aumenten a €76.7 miles de millones en 2050. (Hendrickx, Boudin, & Hul, 2015).

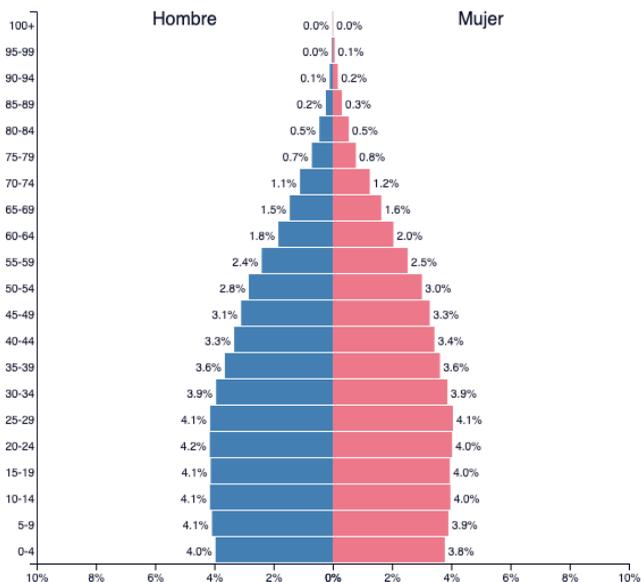


Figura 1. Proyección de edades en México 2025, nótese la inversión en las edades, aumentando en la parte superior que representa los grupos más grandes. Imagen obtenida de PopulationPyramid.net

Por su forma de presentación, la OP se clasifica en dos tipos: primaria y secundaria (Alejandro & Constantinescu, 2018). La primera se caracteriza por presentarse en la etapa adulta y no se acompaña de ninguna enfermedad que pueda explicarla, así como ausencia de medicamentos que involucren el metabolismo óseo, se debe a la afección del hueso trabecular por el déficit de estrógenos en el cuerpo, por lo que

es casi exclusivamente de las mujeres en edad postmenopáusica y se asocia a fracturas de cadera y cuerpos vertebrales (Barrera-Cruz, Cano-Perez, Gallardo-Wong, Mendoza-Salazar, & al, 2009). En ella enfocaremos este estudio. La secundaria se debe a enfermedades ya sean metabólicas, endócrinas, renales, reumáticas y secundarias a algunos fármacos que pueden explicarla, se manifiesta en cualquier etapa de la vida y se presenta en hombres y mujeres (Valdés-flores, Casas-ávila, Falcón-ramírez, & Ponce-de-león-suárez, 2012).

Los factores de riesgo conocidos se dividen en extrínsecos e intrínsecos. Los primeros son modificables por el individuo, dentro de los que se encuentran el uso prolongado de esteroides, tabaquismo activo, el abuso en el consumo de sustancias alcohólicas, sedentarismo, ingesta inadecuada de calcio, ingesta inadecuada de vitamina D y bajo índice de masa corporal (IMC) (Barrera-Cruz, Cano-Perez, Gallardo-Wong, Mendoza-Salazar, & al, 2009). Los factores intrínsecos no son modificables por el individuo y dentro de ellos se encuentran la edad avanzada, pertenecer al sexo femenino, población blanca o asiática, disminución en la DMO e historia familiar positiva para la enfermedad (Recker, 2004).

También existen factores de protección, los cuales se dividen en modificables y no modificables (Valdés-Flores, Casas-Ávila, Falcón-Ramírez, & Ponce-de-León-Suárez, 2012). Dentro de los modificables se encuentra el peso, ya que se ha visto una relación entre el sobrepeso y una disminución en el riesgo de padecer esta enfermedad, aunque no se ha dilucidado la causa por completo, el llevar una dieta rica en vitamina D y calcio además de la realizar regularmente actividad física. Entre los no modificables, están la edad y los antecedentes heredofamiliares negativos para la enfermedad (Rosales-Aujang, Muñoz-Enciso, & Arias-Ulloa, 2014). Estos se encuentran resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Factores de riesgo modificables y no modificables asociados a osteoporosis modificada de (Valdés-Flores, Casas-Ávila, Falcón-Ramírez, & Ponce-de-León-Suárez, 2012)

<b>Factores no modificables</b>	<b>Factores modificables</b>
Sexo femenino	Sedentarismo
Edad avanzada	IMC considerado como desnutrición
Grupo étnico	Tabaquismo

Antecedentes heredofamiliares de osteoporosis	Ingesta de bebidas alcohólicas
Antecedente personal de fracturas	Déficit en vitamina D

IMC: índice de masa corporal

Clínicamente no se ha encontrado un fenotipo relacionado al riesgo de padecer osteoporosis, por lo mismo la OP se ha descrito como una enfermedad “silenciosa”, ya que la disminución de la masa ósea no ocasiona síntomas per se (Brown & Fortier, 2006). Esto hace importante su diagnóstico temprano con el fin de prevenir fracturas y complicaciones secundarias a las mismas.

Las fracturas, son la manifestación más importante de esta enfermedad y se definen como la pérdida de la continuidad ósea y en ocasiones comprometen el flujo sanguíneo de la región (Keita I, 2007). Frecuentemente se producen por caídas de la propia altura del paciente y característicamente ante traumatismos de bajo impacto. Ocasionalmente, los pacientes refieren padecer dolor músculo esquelético. Algunos presentan microfracturas que generan disminución en la altura

de los cuerpos vertebrales ocasionando la reducción de la distancia entre los mismos, lo que conlleva a alteraciones posturales como lo son el aumento de cifosis torácica y cambios cervicales.

El diagnóstico de OP se realiza mediante la medición de la DMO obtenida mediante densitometría ósea radiológica de doble energía (DXA), misma que fue introducida en la práctica clínica hace aproximadamente 30 años y actualmente considerada como estándar de oro (Alexeeva, Burkhardt, Christiansen, & Cooper, 1994). La DXA evalúa el contenido mineral óseo en gramos dividido entre el área de hueso en  $\text{cm}^2$ , lo cual nos otorga una medición de la DMO en  $\text{g}/\text{cm}^2$  (Lane, 2006). Esta medición se realiza en fémur proximal, columna vertebral (L1- L4) y/o antebrazo y compara estos valores con un valor promedio basado en peso, género y edad, se refieren los valores en dos parámetros, el T score y el Z score.

El T- score es la calificación obtenida mediante la medición de la densidad promedio mineral del hueso en comparación con un adulto joven en buen estado de salud. La diferencia entre estos dos valores se reporta en desviaciones estándar (DE), y si el valor es menor a -1, más baja es la DMO

del sujeto analizado y mayor su riesgo a fracturarse. La calificación entre +1 y -1 se considera saludable (Alexeeva, Burkhardt, Christhansen, & Cooper, 1994). Se han visto limitaciones en este estudio ya que solo se ha estandarizado para mujeres post menopáusicas de raza blanca y no se toma en cuenta en componente cualitativo del hueso, así como la aplicación limitada a ciertas zonas del cuerpo (Morales-Torres, Clark, Delezé-Hinojosa, & Cons-Molina, 2010)

El valor Z se utiliza para comparar la DMO del paciente con la de un grupo de la misma edad, etnia y sexo para evitar sesgos, actualmente se recomienda que sea siempre comparado con el de una mujer. Se calcula restando la DMO media del grupo al que corresponde el paciente a la DMO que obtuvo en el estudio y se divide entre las desviaciones estándar del grupo de referencia. El diagnóstico de osteopenia se establece cuando los valores se encuentran entre -1 a -2.5 desviaciones estándar (Alexeeva, Burkhardt, Christhansen, & Cooper, 1994). Ante este diagnóstico, los cambios en el estilo de vida como evitar el sedentarismo, tabaquismo, aumentar la ingesta de vitamina D y eliminar la ingesta de bebidas alcohólicas son de suma importancia. De esta manera se puede ayudar a

preservar la DMO y evitar las fracturas. Los criterios diagnósticos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios diagnósticos para OP

Definición de osteoporosis y osteopenia basado en la DMO (Zanker & Duque, 2018)	
Clasificación	DMO en cuello femoral T score
Normal	De + 1 a -1 DE
Osteopenia	-1.0 a -2.5 DE
Osteoporosis	< - 2.5 DE
Osteoporosis severa	< -2.5 DE o más con una fractura previa

DMO: densidad mineral ósea. DE: desviaciones estándar. Obtenida de (Alexeeva, Burkhardt, Christhansen, & Cooper, 1994)

Una vez confirmado el diagnóstico de OP, es necesario complementar con estudios de gabinete para descartar posibles causas secundarias y valorar los niveles de vitamina D y calcio para determinar la necesidad de la suplementación ya que cada persona es diferente (Lane, 2006).

En el 2008, la OMS implementó el FRAX (Fracture Risk Assessment Tool) como herramienta para la evaluación de riesgo de fracturas de cadera que combina los factores de

riesgo clínicos con o sin DMO (Leslie, Majumdar, Johansson, A, & al, 2012). No se considera diagnóstica ya que es un estudio de tamizaje que calcula la probabilidad a 10 años de cualquier persona a una de las tres principales fracturas (cadera, vértebras y radio distal) (Morales-Torres, Clark, Delezé-Hinojosa, & Cons-Molina, 2010). Tiene como utilidad detectar grupos de alto riesgo en los que es importante mantener una vigilancia estrecha y así optimizar los recursos diagnósticos y tratamientos de manera oportuna. Sin embargo, a pesar de las indicaciones en guías y los beneficios clínicos, se estima que 1 de cada cuatro mujeres elegibles no se han realizado ningún estudio. Se recomienda que todas las mujeres arriba de 65 años de edad se sometan a una prueba de detección de OP, mediante la medición de la DMO en cadera y columna lumbar (Antolín López, Gómez Herrera, Ramírez Hurtado, & Ríos Mejía, 2018). Sin embargo, en México se recomienda que se realice en mujeres a partir de los 50 años (Antolín López, Gómez Herrera, Ramírez Hurtado, & Ríos Mejía, 2018).

El tratamiento de la OP se divide en farmacológico y no farmacológico. El no farmacológico consiste primariamente en cambiar el estilo de vida de la persona, así como cambiar los factores de riesgo modificables, como suspender el

tabaquismo, nutrición adecuada, realizar actividad física, evitar el café y el alcohol, entre otros (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013).

El tratamiento farmacológico de la OP se centra en inhibir la resorción ósea y estimular la misma (Barrera-Cruz, Cano-Perez, Gallardo-Wong, Mendoza-Salazar, & al, 2009), siendo su principal objetivo el evaluar y prevenir el riesgo de fractura (Brown & Fortier, 2006). Los medicamentos utilizados en el tratamiento de la OP se dividen en dos grupos según su efecto predominante sobre el hueso: en primer lugar, están los inhibidores de la resorción ósea y en segundo lugar se encuentran los neoformadores óseos. La eficacia de estos se determina por el porcentaje de prevención de fracturas en cuerpos vertebrales o de otro sitio (Batur, Rice, Barrios, & Sikon, 2017). Las opciones actuales de tratamiento aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) son los Bifosfonatos (Alendronato, Risedronato), Raloxifeno y Calcitonina (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013).

Actualmente, el tratamiento preventivo se realiza en mujeres con factores de riesgo que cumplan los criterios para

iniciar la terapia. Ésta se lleva a cabo vía oral con bifosfonatos, ya que las fracturas se asocian a aumento en los costos de salud pública por estancia hospitalaria, requerimiento de cirugía, discapacidad laboral y morbi- mortalidad (Albert & Reddy, 2017) (Batur, Rice, Barrios, & Sikon, 2017).

Además de los factores ambientales, también hay factores genéticos implicados en el desarrollo de la OP, lo cual se ha estudiado de manera intensa en los últimos años (Styrkarsdottir, Halldorsson, Gretarsdottir, Gudbjartsson, & al, 2008). La OP es una afección multifactorial y poligénica, que resulta de la interacción de diversos genes con el ambiente, lo que hace de su prevención y terapia génica un reto hasta el día de hoy. La heredabilidad se define como la proporción de variación fenotípica que es atribuible a los componentes genéticos. Diversas investigaciones estiman que la heredabilidad de la DMO de columna y cadera oscila entre 70-85% (Ralston & Ralston, 2000).

Las diferencias en el genoma son importantes para la evolución, ya que confieren características específicas que serán conservadas en caso de otorgar una ventaja a la especie (Inieta, Guinó, & Moreno, 2005). Mucho se ha estudiado

acerca de los cambios en el genoma y se ha encontrado que éste presenta alteraciones que no necesariamente confieren una enfermedad o desventaja, estas variantes pueden estar relacionadas tanto con un factor protector como de riesgo (Del Castillo, 2012)

Estas variantes, denominadas polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) contribuyen a la variación fenotípica entre los individuos, influyendo en las características físicas de cada uno y el riesgo de padecer enfermedades. Los SNP se definen como una variación en un solo nucleótido en una ubicación específica del genoma, presente forzosamente y por definición, en más del 1% de la población (Brookes, 1999). Son la variación genética más frecuentemente encontrada en el genoma humano. El número total reportado hasta ahora, supera los 9 millones (Kim & Misra, 2007). La frecuencia promedio de los SNP en el genoma humano es de uno cada 300- 1000 pares de bases (pb) (Waterston & McPherson, 2001).

Los SNP pueden ser relevantes para la susceptibilidad de la enfermedad, patogenia de la misma y/o eficacia de fármacos específicos, por lo que se han realizado numerosos estudios intentando dilucidar la relación entre los SNP de una

población y diversas enfermedades. Los métodos para detectar SNP deben ser altamente sensibles y específicos (Matsuda, 2017).

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) se utilizan para analizar la variación genética entre cierto polimorfismo y alguna característica de un grupo selecto de personas que la comparten. El método implica el análisis de genomas de una gran cantidad de individuos diferentes y la búsqueda de marcadores genéticos que puedan estar o no asociados a la enfermedad que se esté estudiando, una vez que se identifican, se pueden hacer estudios en poblaciones específicas para valorar la presencia o ausencia de estos en población seleccionada.

Se han realizado estudios de asociación para valorar si existe una asociación entre SNPs y el riesgo de padecer osteoporosis (Urano & Inoue, 2014). En ocasiones, los genes asociados no tienen una clara función en el metabolismo óseo o con la enfermedad, pero se han visto asociados en la vía. En otras ocasiones, al gen estudiado no se le encuentra la relación con la enfermedad. La cantidad de genes analizados en estos

estudios es muy grande, ya que el fenotipo óseo requiere de distintas vías y mediadores para generar la microarquitectura.

En el catálogo de GWAS se han asociado casi 400 SNPs con baja DMO y OP, distribuidos en alrededor de 150 loci diferentes (Hidalgo- Bravo, Parra-Torres, Casas-Avila, & Jimenez-Ortega, 2018). En población mexicana se han realizado diversos estudios para encontrar la asociación entre SNPs y fractura de cadera, en un estudio realizado por Hidalgo y colaboradores, se asociaron ciertos SNPs estudiados de los genes *RMND1*, *CCDC170* y *ESR1* con fractura de cadera, osteopenia y OP (Hidalgo- Bravo, Parra-Torres, Casas-Avila, & Jimenez-Ortega, 2018).

En el presente estudio, se analizaron cuatro SNPs localizados en cuatro genes para valorar su asociación con el riesgo a padecer una fractura de cadera secundaria a OP, se observó que los genes tuvieran algún papel en el remodelamiento óseo y que pudieran estar asociados a la OP de mujeres en México. Los genes incluidos en el estudio fueron *WNT16*, *SOX6*, *SLIT3* y *PKDCC*.

En distintos artículos se ha verificado la importancia del gen *WNT16* para la densidad mineral ósea, la fuerza esquelética, riesgo de fractura y el grosor del hueso cortical, el cual constituye el 80% de la masa ósea (Movérare-Skrtic, Henning, Liu, Nagano, & al, 2014). *WNT16* se encuentra en 7q31.31 y pertenece a una familia de glicoproteínas que en mamíferos consta de 19 miembros (Movérare-Skrtic, Henning, Liu, Nagano, & al, 2014). Es un regulador fisiológico del hueso cortical, no del trabecular como Ohlsson y colaboradores describieron en el 2017 (Ohlsson, Nilsson, Hennin, Wu, & al, 2017). Este gen, codifica para una proteína que pertenece a una familia de glucoproteínas ricas en cisteína que se están involucradas en la vía WNT- $\beta$ -catenina, también llamada vía canónica y vía no canónica WNT (dependiendo de la capacidad de activar la  $\beta$ -catenina). El producto de este gen es un regulador de la masa ósea involucrado en ambas vías. Su función es ayudar a mantener la homeostasis y preservar el grosor del hueso cortical (Gori, Lerner, Ohlsson, & Baron, 2015), si no se encuentra expresado, el hueso tiende a ser más frágil y a romperse.

Se ha demostrado que el *WNT16* inhibe la producción de osteoclastos de manera directa al actuar sobre sus células

progenitoras, así como de manera indirecta al aumentar la expresión de osteoprotegerina en los osteoblastos (Movérare-Skrtic, Henning, Liu, Nagano, & al, 2014). Esta inhibición ocurre principalmente en huesos no vertebrales por lo que su expresión disminuye el riesgo de fracturas en los mismos ya que expresarían menor cantidad de osteoclastos.

Los polimorfismos estudiados en ciertas regiones del gen se han visto involucrados en la disminución de la DMO, el grosor del hueso cortical y el riesgo de fractura en huesos no vertebrales (Movérare-Skrtic, Henning, Liu, Nagano, & al, 2014). En 2015, el equipo de Foroud y colaboradores identificaron la asociación entre la DMO y diversos genes al realizar un metaanálisis en el que incluyeron cuatro cohortes de mujeres jóvenes premenopáusicas (n= 4,061 mujeres entre 20- 45 años de edad) para identificar genes que influyen en el pico máximo de masa ósea. Sus resultados confirmaron que estos genes varían entre los rangos de edad y sexo. En particular, el SNP rs3801387 del gen *WNT16* ( $p= 1.7 \times 10^{-9}$ ) y rs4870044 del gen *ESR1* ( $p= 1.3 \times 10^{-8}$ ) (Wilcox & Hirshkowitz, 2015)

El gen *SOX6* (SRY-box 6) es un miembro de la familia SOX de factores de transcripción que se caracterizan por poseer un dominio de unión al ADN del grupo de alta movilidad (Dy, Smits, Silvester, Penzo-Méndez, & al, 2010); cuya secuencia es aproximadamente 50% igual a la del factor determinante del sexo SRY (Correa- Rodríguez, Schmidt Rio-Valle, & Rueda-Medina, 2018). *SOX6* se expresa en varios tejidos, predominantemente en músculo esquelético y es esencial en la condrogénesis y la formación de cartílago (Lefebvre, Behringer, & Crombrughe, 2001), pues es el encargado de activar la expresión de proteínas como el colágeno de tipo II, el agregacán y el matrilin- 1. Se ha demostrado que *SOX6* induce hipertrofia de condrocitos y permite la formación de zonas prehipertróficas e hipertróficas en las placas de crecimiento del cartílago (Smits, Li, Mandel, Zhangh, & al, 2001).

En el 2012, Yang y colaboradores se dieron a la tarea de investigar si *SOX6* podría ser un nuevo candidato asociado a la DMO. Se investigaron SNPs dentro del gen en tres grupos de muestras de dos razas para identificar si las variantes identificadas eran comunes o específicas de cada etnia. En ese estudio, se confirmó la asociación entre el SNP rs7117858 y la

DMO tanto en las poblaciones chinas como en las caucásicas (Yang, Guo, Liu, Shen, & al, 2012).

Localizado en el cromosoma 5, el gen *SLIT3* (ligando de guía de hendidura 3, por sus siglas en inglés) inicialmente se vio involucrado en el adecuado desarrollo de las estructuras de la línea media cerebral y en el cruce de los axones en la misma estructura (Kidd, Bland, & Goodman, 1999). Sin embargo, las proteínas SLIT se han visto involucradas en diversos procesos de regulación de distintos tejidos, tales como glándula mamaria, corazón, pulmón y riñón (Macias, Moran, Samara, & Moreno, 2011). Actualmente, se sabe que *SLIT3* tiene un papel osteoprotector al estimular la formación ósea y disminuir la resorción de la misma. Se ha demostrado que en conjunto con su receptor ROBO2 promueve la maduración de los condrocitos mediante la inhibición de la señalización  $\beta$ -catenina, la cual promueve la diferenciación de osteoblastos, pero suprime la diferenciación de condrocitos (Hanjun, Choi, Lee, Park, & al, 2018). Es un factor crucial para la osificación endocondral durante el desarrollo del hueso embrionario (Hanjun, Choi, Lee, Park, & al, 2018). En su estudio del 2018, H Kim y colaboradores refieren que hasta la fecha no hay un estudio sobre el papel de SLIT/ ROBO en la osificación

endocondral (Hanjun, Choi, Lee, Park, & al, 2018). El papel que tiene la proteína en la remodelación ósea ha sido objeto de estudio y se ha observado que ratones nulos para *SLIT3* presentan alteraciones óseas, por ejemplo, acortamiento en la longitud de los huesos largos (Xu, Yallowitz, Qin, Wu, & al, 2018). Se han visto reportes de análisis de polimorfismos relacionados al gen *SLIT3*, pero no se han visto asociaciones con la densidad mineral ósea. En un estudio realizado en población mexicana se utilizaron dos sondas para valorar la asociación entre el gen *SLIT3* y la densidad mineral ósea, sin embargo, no se encontraron valores significativos (Villalobos-Comparán, Jiménez-Ortega, Estrada, Parra-Torres, & al, 2017).

*PKDCC* es un gen previamente conocido como *VLK* (cinasa solitaria de vertebrado, por sus siglas en inglés) que funciona como mediador de la fosforilación de proteínas extracelulares involucradas en la organogénesis que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2. De igual manera, se requiere para el crecimiento longitudinal del hueso a partir de la regulación de la diferenciación de condrocitos (Zhou, Mori, Ishizaki, & Takahashi, 2016). En el 2016, Zhou y colaboradores, investigaron si había alguna asociación entre el gen *PKDCC* y las fracturas de cadera, sin embargo, no

encontraron resultados estadísticamente significativos (Zhou, Mori, Ishizaki, & Takahashi, 2016).

Los genes anteriormente descritos se han visto relacionados con la regulación del metabolismo óseo, por lo que en este estudio se buscó la asociación de polimorfismos en dichos genes con el riesgo a padecer OP o una fractura de cadera secundaria a OP en individuos mexicanos.

### **3. Planteamiento del problema**

La osteoporosis es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por disminución de la densidad mineral ósea y tiene como consecuencia la aparición de fragilidad en los huesos que puede desencadenar episodios de fracturas tanto primarias como de repetición.

En distintos países se ha hecho la correlación de los gastos generados por las fracturas secundarias a OP, así como su tratamiento a largo plazo, siendo de aproximadamente \$17 mil millones de dólares anuales en Estados Unidos en el 2006 (Lane, 2006), en México superó los \$97 millones de dólares ese mismo año (Clave, 2020). De la misma manera, el tiempo de

estancia intrahospitalaria por fractura de cadera se calculó en distintas instituciones, siendo el IMSS el promedio más alto con 10.7 días por evento, mientras que la SSA 9.3 y las instituciones privadas un promedio de 5.3 días.

Se han descrito algunas variantes genéticas asociadas a la presencia de OP y fractura de cadera en diferentes poblaciones. Estas variantes pueden ayudar en la identificación de la población en riesgo y la implementación de medidas preventivas adecuadas. Actualmente, el INR es centro de referencia para pacientes con esta patología, con una línea de investigación para la comprensión de esta enfermedad.

El estudio de SNPs aunado al diagnóstico temprano de la enfermedad, ayudaría a determinar mejor el pronóstico y encaminar un tratamiento preventivo en las pacientes con riesgo. La detección oportuna brinda la oportunidad de actuar tempranamente en la enfermedad, disminuyendo las probabilidades de complicaciones y costos, mejorando así la calidad de vida de las pacientes. Este estudio será de gran utilidad para demostrar o descartar SNPs asociados en nuestra población.

El análisis de polimorfismos es un área de oportunidad, el avance que se pueda tener en la misma podría abrir la puerta a una estrategia para la disminución de costos al favorecer la prevención de fracturas y disminuir las complicaciones de las mismas, que implican aumentos en la estancia hospitalaria, como el riesgo de infecciones, caídas y muerte.

#### **4. Justificación**

La OP se considera un problema de salud pública internacional, ya que se acompaña de tasas elevadas de morbilidad y genera grandes costos económicos tanto para el país como para la persona y problemas sociales a la misma. Se estima que en México la prevalencia de OP es de 3 millones de casos y aproximadamente 6 millones con osteopenia, lo cual irá en aumento conforme se invierta la pirámide poblacional.

Actualmente, hay muy pocos estudios de asociación de SNPs y OP en población mexicana. Esta investigación busca encontrar asociaciones entre los polimorfismos estudiados y las fracturas de cadera para obtener más herramientas que ayuden a la prevención de la enfermedad.

## 5. Objetivos

### **General:**

- Investigar si los SNPs rs3801387, rs7108731, rs10036727 y rs7584262 en genes relacionados al metabolismo óseo (*WNT16*, *SOX6*, *SLIT3* y *PKDCC* respectivamente) se encuentran asociados a fracturas de cadera en pacientes mexicanas post menopáusicas con diagnóstico de osteoporosis.

### **Específicos:**

- Analizar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs rs3801387, rs7108731, rs10036727 y rs7584262 en un grupo de pacientes mexicanas postmenopáusicas con fractura de cadera secundaria a OP, un grupo de pacientes con diagnóstico de OP y en un grupo de mujeres sin evidencia de OP.
- Determinar si las frecuencias alélicas y genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg (HW)
- Analizar mediante un modelo de regresión logística si existe asociación de algún SNP con la fractura de cadera ajustando por potenciales variables confusoras tales como edad, IMC y años desde la menopausia.

- Explorar con el análisis de regresión logística los modelos de herencia autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y aditivos para determinar cuál explica mejor la asociación de los SNPs con la fractura de cadera.

## **6. Material y métodos**

Diseño del estudio: casos y controles.

Se incluyeron mujeres mexicanas atendidas en el Instituto Nacional de Rehabilitación entre los años 2008- 2015. El estudio fue aprobado por los comités de investigación y ética en investigación. Los participantes firmaron un consentimiento informado (anexo 1).

### **Población de estudio:**

Criterios de selección de la muestra:

#### **1. Criterios de inclusión**

- a. Mujeres, post menopáusicas, que recibieron atención médica en el INR, con fractura de cadera secundaria a trauma de baja energía. Con ancestría mexicana confirmada mediante

genealogía de tres generaciones de origen mexicano.

- b. Mujeres, post menopáusicas, que cuenten con diagnóstico de osteoporosis mediante densitometría ósea y que cuenten con al menos tres generaciones de origen mexicano.
- c. Controles: mujeres post menopáusicas, ingresadas al INR por diferente patología en las que, mediante densitometría, se descarte diagnóstico de Osteoporosis y que, mediante genealogía, se observen tres generaciones de origen mexicano.

## **2. Exclusión**

- a. Pacientes o controles que cuenten con antecedentes de consumo de medicamentos que alteren el metabolismo óseo o los consuman actualmente tales como los esteroides, tamoxifeno, vitamina B12 en exceso, inhibidores del receptor de estrógenos, hormonas tiroideas, isotretinoína, entre otros.
- b. Pacientes o controles que no tengan al menos tres generaciones de origen mexicano.

- c. Pacientes o controles que tengan diagnóstico de alguna neoplasia o enfermedad ósea concomitante.
- d. Individuos cuya muestra de ADN no sea útil para el análisis.

Se incluyeron 141 mujeres con fractura de cadera secundaria a osteoporosis, 141 mujeres con osteoporosis sin fractura y 141 mujeres sin fractura de cadera sin osteoporosis.

### **Extracción de DNA**

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de DNA basándose en las características físico-químicas de las moléculas (Patricia, Velázquez, Aragón, & Romero, 2008). Se recolectaron 141 muestras de cada grupo de pacientes (OP, controles y fractura) previo consentimiento informado de las pacientes. Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica en Vacutainer con EDTA para prevenir la coagulación.

Se utilizó el protocolo para la purificación de DNA genómico de 10ml de sangre periférica utilizando el kit Gentra Puregene (Qiagen).

Se realizó el protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se vertieron 9ml de solución de lisis RBC en un tubo de 15ml, se añadieron 3ml de sangre periférica y mezcló por inversión
2. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15- 25°C) y se invirtió gentilmente una vez durante la incubación
3. Se centrifugó durante 2 minutos a 2000 x g
4. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante mediante pipeteo y se dejaron aproximadamente 200 ul del sobrenadante y el sedimento en el tubo
5. Vigorosamente se agitó el tubo para re suspender el sedimento en el líquido residual, esto favoreció la lisis para el siguiente paso
6. Se añadieron 3ml de solución de lisis celular y se agitó vigorosamente durante 10 segundos aproximadamente para lisar las células
7. Se incubó a 37°C por 2 horas
8. Se agregaron 1ml de solución de precipitación proteica y se movió vigorosamente durante 20 segundos a alta velocidad

9. Se centrifugó por 5 minutos a 2000 x g
10. Se agregaron 3 ml de isopropanol en un tubo de centrifuga limpio de 15ml.
11. Se mezcló invirtiendo suavemente 50 veces hasta que el DNA fue visible
12. Se centrifugó durante 3 minutos a 2000 x g
13. Decantó con cuidado el sobrenadante y drenó el tubo invirtiéndolo en una hoja limpia de papel absorbente, se tuvo cuidado de que el sedimento permaneciera en el tubo
14. Se añadieron 3 ml de etanol al 70% e invirtió varias veces para lavar el sedimento de ADN
15. Se centrifugó 1 minuto a 2000 x g
16. Se decantó con cuidado el sobrenadante. Se drenó el tubo en una hoja limpia de papel absorbente y se tuvo cuidado en que el DNA permanezca en el tubo. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 5- 10 minutos
17. Se agregaron 300ul de solución de hidratación de ADN y se agitó en vórtex durante 5 segundos a velocidad media para mezclar
18. Se incubó a 65°C por una hora para disolver el ADN

19. Se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave. Nos aseguramos de que la tapa del tubo estuviera bien cerrada para evitar fugas.

Al terminar, se almacenaron en  $-80^{\circ}$  para garantizar la conservación de las muestras. Para su uso, las muestras se descongelaron y fueron sometidas a análisis para determinar la concentración y factor de pureza determinando la absorbancia a 260 y 280 nm con un equipo Biodrop. Se realizó la dilución de las muestras para homogeneizar las concentraciones del DNA a una concentración final de 12.5 ng/ul.

### **Genotipificación**

La genotipificación mediante PCR consiste en la reacción en cadena de la polimerasa, la cual realiza numerosas copias de una secuencia deseada mediante múltiples ciclos, su objetivo es la amplificación directa de un fragmento o región de DNA. Esto lleva a la cuantificación de los productos en cada ciclo mediante la medición de una molécula fluorescente previamente definida. Es indispensable conocer la secuencia de DNA que se quiere amplificar.

Las aplicaciones de esta técnica son muy numerosas entre las que se encuentran: clonación acelular, preparación de muestras para secuenciación, estudios evolutivos, diagnóstico prenatal, estudios forenses, detección de microorganismos infecciosos, entre otros. Para la realización de la PCR, se requieren los cuatro dNTP como sustrato para la síntesis de las copias de DNA, acompañados de  $Mg^{+}$  como cofactor de la enzima, dos oligonucleótidos cuyas secuencias deben ser complementarias a los dos extremos 3' de la región diana para que ejerzan como cebadores y una DNA polimerasa termoestable ya que para evitar que las cadenas se unan nuevamente, se utilizarán temperaturas elevadas. La más utilizada es la Tac polimerasa, nombrada así por proceder de la bacteria *Thermus Aquaticus*.

La metodología resulta de la aplicación de tres principios: desnaturalización, hibridación y replicación, el primero se refiere al proceso mediante el cual las hebras de DNA se separan formando moléculas monocatenarias. La hibridación permite el emparejamiento de la hebra monocatenaria de interés con los oligonucleótidos cebadores. La replicación, también conocida como elongación, es la etapa de amplificación propiamente dicha, en la que la DNA polimerasa

termoestable elonga a los cebadores, utilizando como molde las hebras originales. La replicación ocurre del extremo 5' a 3'. Mediante estos, se consigue un alto número de copias del fragmento deseado en un periodo corto de tiempo. Las secuencias que pueden replicarse mediante este método son aquellas entre 50pb y 50kb. La PCR en tiempo real permite medir la cantidad de moléculas que se van amplificando el DNA en cada ciclo.

Se utilizaron sondas Taqman, para los SNPs rs3801387, rs7108738, rs10036727 y rs7584262, capaces de discriminar la diferencia entre nucleótidos. Éstas se encuentran marcadas con un fluoróforo de diferente longitud de emisión. Las sondas Taqman son moléculas de DNA que contienen una molécula fluorescente en el extremo 5' de la cadena y una molécula que absorbe la fluorescencia al estar a una determinada distancia en el extremo 3'. La región de la cadena a la que se unen es complementaria al DNA que se quiere amplificar.

La TaqDNA polimerasa, es una enzima termoestable la cual tiene actividad de 5' exonucleasa, degradando así a la sonda Taqman, permitiendo la separación de la molécula fluorescente del apagador. VIC y FAM son las moléculas

fluorescentes. Éstas responden a longitudes de onda determinada, las cuales son censadas por el equipo para emitir fluorescencia. De esta manera se permite que la fluorescencia se reporte en la PCR. Las señales de cada alelo corresponden a señales VIC o FAM dependiendo de las condiciones del fabricante y así se detecta el estado homocigoto o heterocigoto de las muestras, por la fluorescencia detectada.

La detección de los polimorfismos se llevó a cabo mediante PCR tiempo real empleando un equipo *Step One Real Time PCR System* de 96 pozos. Cada reacción de PCR contenía 0.125 ul de sonda Taq Man, marcadas con fluorescencia con VIC o FAM de acuerdo a las condiciones del fabricante (Applied Biosystems), 4.94 ul de Master Mix Genotyping en concentración 2X y 5 ng de DNA genómico para contar con un volumen total de 10 ul. Los componentes de cada reacción de PCR se muestran en la tabla 3.

Para el ciclado se usaron las condiciones recomendadas:

- Desnaturalización inicial:
  - Tiempo: 10 minutos
  - Temperatura de 94°C

- 45 ciclos
  - Tiempo: 15 segundos
  - Temperatura: 92°C
  - 1 minutos a 60°C.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR

Reactivos	Concentración stock	Volumen (ul)	Concentración final
DNA	5ng/ul	5	25 ng/ul
Master mix Genotyping	2X	4.94	1X
Sonda	40X	0.125	1
Total		10	

En las placas que constaban de 96 pozos, se incluyeron 6 pozos para NTC (control negativo) –en los cuales no se encontraba DNA – y 6 pozos de pacientes con genotipo previamente conocido como control de la placa. También se verificó que la placa no se encontrara contaminada. En caso de que algún pozo no fuera concluyente, se repitió la reacción para obtener la mayor cantidad de muestras posibles.

## 7. Análisis estadístico

Se utilizan las frecuencias alélicas para determinar los alelos de riesgo en las poblaciones, estos alelos se encuentran ya definidos en bases de datos establecidas. Se consideran los alelos menos frecuentes como de riesgo a padecer enfermedades, así como los más frecuentes como los de protección.

Se utilizaron diferentes modelos de herencia, el aditivo nos dice que entre más copias del alelo de riesgo se tengan, mayor será riesgo de padecer la enfermedad. El modelo dominante, propone que con una copia del alelo de riesgo se incrementa la probabilidad de padecer la enfermedad de la cual se está hablando, y ser portador de ambos alelos no confiere un mayor riesgo a padecerla. El modelo codominante es el más general, cada genotipo proporciona un riesgo de una enfermedad diferente y no es aditivo, se compara homocigotos y heterocigotos por separado. El modelo recesivo supone que son necesarias las dos copias del alelo menos frecuente para modificar el riesgo, por lo tanto, los heterocigotos tienen el mismo riesgo de parecer la enfermedad que los homocigotos para el alelo ancestral. Una vez descrito esto, se acoplaron los grupos estudiados a cada uno de los tipos de herencia para

determinar si se encontraba alguna asociación entre los genotipos y el riesgo a padecer OP o fracturas de cadera secundarias a OP.

A los polimorfismos utilizados, se les evaluó el equilibrio de Hardy- Weinberg el cual determina las frecuencias que deberían observarse en la población para cada genotipo en función de la frecuencia de los alelos y se confirmaron mediante la prueba de chi cuadrada. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de regresión logística utilizando las variables de edad, edad de menarca, IMC, años desde la menopausia y genotipo de los tres grupos con el software Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Se utilizó la T de student para averiguar si hay una diferencia real entre las medias de dos grupos. Se fundamenta en dos premisas, la primera es la distribución de la normalidad y la segunda que las muestras sean independientes.

## **8. Resultados**

En este estudio se incluyeron 141 pacientes femeninas diagnosticadas con OP, 141 pacientes con fractura de cadera

secundaria a OP y 141 controles, sumando un total de 423 individuos. Todas las pacientes son pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación y firmaron un consentimiento informado para el presente estudio. Se analizaron los criterios de inclusión y exclusión en cada una de ellas. Se analizó cada una de las cuatro sondas en cada paciente, agrupándose por polimorfismo para el análisis.

Se buscaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos en la base de datos Ensembl. Se observa que en el SNP rs3801387 el alelo A es más frecuente que el G con frecuencias de 0.74 y 0.26 respectivamente en población global, mientras que en población mexicana fue de 0.67 y 0.32 respectivamente. En el SNP rs7108738 el alelo T tiene una proporción de 0.78 mientras que el G de 0.22 en población global, en población mexicana se observó de igual manera que el alelo T fue más frecuente con 0.69, mientras que el G tiene una proporción de 0.3. En el SNP rs10036727 el alelo T tiene una frecuencia de 0.57 mientras que el C de 0.43, mientras que en población mexicana la proporción es igual entre los alelos con 0.5 y 0.5. Finalmente, en el SNP rs7584262, el alelo C fue más frecuente con una proporción de 0.78 comparado con el T de 0.22, en población

mexicana la proporción fue de 0.89 en el alelo C mientras que en el T fue de 0.10. Estos datos se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4. Frecuencias alélicas de los polimorfismos reportados en la base de datos Ensembl

SNP	Gen	Localización	Alelo 1	Alelo 2	Global	Global	MXL 1	MXL 2
rs3801387	<i>WNT16</i>	chr7:2134711	A	G	0.74	0.26	0.67	0.32
rs7108738	<i>SOX6</i>	chr11:15688538	T	G	0.78	0.22	0.69	0.3
rs10036727	<i>SLIT3</i>	chr5:168753076	T	C	0.57	0.43	0.5	0.5
rs7584262	<i>PKDCC</i>	chr2:42023409	C	T	0.78	0.22	0.89	0.1

MXL: Población Mexicana en los Angeles, Ca, EU.

En las tablas 5 y 6 se muestran variables demográficas recolectadas en los grupos de estudio. Se calcularon las medias de los grupos independientes y se calcularon las desviaciones estándar. Se compara el grupo de controles contra el grupo de pacientes con fractura de cadera secundaria a osteoporosis utilizando la prueba T de Student.

Tabla 5. Variables de los grupos estudiados en cuanto a edad en medias, IMC, menarca y años de menopausia.

	Fractura cadera	Controles	Prueba de T	Valor de P
Edad	79.53 ( $\pm$ 10.03 DE)	56.51 ( $\pm$ 8.05 DE)	-23.02 (IC -25.15 - -20.8)	<0.001
IMC	24.53 ( $\pm$ 4.04 DE)	28.67 ( $\pm$ 3.98 DE)	4.28 (IC 3.15 - 5.4)	<0.001
Menarca	13.37 ( $\pm$ 1.27 DE)	12.67 ( $\pm$ 1.49 DE)	-0.21 (IC -0.79 - 0.36)	0.47
Años post menopausia	32.79 ( $\pm$ 11.67 DE)	9.78 ( $\pm$ 9.37 DE)	-22.5 (IC -25.27 - -19.9)	<0.001

IMC: índice de masa corporal. DE: desviaciones estándar. IC: intervalo de confianza

En la tabla 6 se muestran los resultados de la comparación entre el grupo de controles contra el grupo de pacientes con osteoporosis de cadera sin fractura.

Tabla 6. Variables de los grupos de OP comparados con los controles en cuanto a edad, IMC, menarca y años de menopausia.

	OP cadera (medias)	Controles (medias)	Prueba de T	Valor de P
Edad	68.73 ( $\pm$ 9.71 DE)	56.51 ( $\pm$ 8.05 DE)	-12 (IC -14 - -10)	<0.001
IMC	25.05 ( $\pm$ 3.99 DE)	28.67 ( $\pm$ 3.98 DE)	3.41 (IC 2.39 - 4.43)	<0.001
Menarca	13.28 ( $\pm$ 1.5 DE)	12.67 ( $\pm$ 1.49 DE)	-0.6 (IC -1.03 - -0.168)	0.007
Años post menopausia	22.22 ( $\pm$ 22 DE)	9.78 ( $\pm$ 9.37 DE)	-13.25 (IC -15.6 - -10.84)	0.001

IMC: índice de masa corporal. DE: desviaciones estándar. IC: intervalo de confianza

Para la genotipificación, se realizó con las sondas Taqman condiciones descritas previamente en la metodología. La figura 2 ejemplifica los resultados de la discriminación alélica por esta técnica.

Figura 2. Ejemplo de la genotipificación mediante utilizando sondas TaqMan mediante PCR en tiempo real.

Se analizaron las frecuencias alélicas y los genotipos encontrando lo siguiente:

Del SNP rs3801387 en las pacientes con OP se eliminaron tres muestras ya que no pudieron discriminarse manualmente, de las pacientes con fractura se eliminaron dos muestras por la misma razón y de las muestras controles, se eliminó una muestra. En los tres grupos se observó el genotipo A/A como

el más frecuente, encontrándose en 64.4% en el grupo de OP, 58.2% en el grupo de fracturas y 58.5% en el grupo de los controles, el genotipo menos frecuente fue el homocigoto G en los tres grupos como se observa en la tabla 7.

En el SNP rs7108738 se eliminaron 5 muestras del grupo de fracturas ya que no se pudo realizar la discriminación de los genotipos manualmente, los demás grupos se encontraron completos. La frecuencia del genotipo homocigoto para G/G fue la menor reportada en los tres grupos con 4.2%, 8% y 4.2% para OP, fractura y controles respectivamente mientras que el homocigoto T/T fue el más abundante con 63.1%, 61.7% y 68.7% en OP, fracturas y controles respectivamente. El genotipo G/T se encontró en 31.9%, 30.1% y 26.9% de las muestras de los grupos siendo el intermedio. El alelo T fue más observado en todos los grupos con una frecuencia de 79.8%, 76.8% y 82.3% en los grupos de OP, fracturas y controles respectivamente.

En el SNP rs10036727 se eliminó una muestra del grupo control ya que no fue útil para el análisis. Se observó que el alelo más frecuente en el grupo de OP fue el C con 149 muestras, mientras que el T obtuvo 133, en los genotipos se observó el

heterocigoto C/T como el más frecuente con 73 pacientes, teniendo una proporción de 51.7%, mientras que el homocigoto C/C de 38 (26.9%) y el homocigoto T/T 30 (21.2%). En el grupo de fracturas se observó que el alelo T estuvo presente en 156 muestras mientras que el C en 124, en los genotipos se observó el C/T como el más frecuente con 80 muestras correspondiendo al 57.1% del total del grupo mientras que el C/C y el T/T tuvieron 22 y 38, correspondiendo al 15.7% y 27.1% respectivamente. En el grupo controles del mismo SNP se observó el alelo T como el más frecuente estando presente 162 veces mientras que el C en 120. Los homocigotos para C se encontraron en 18 pacientes representando el 12.7% del grupo mientras que el heterocigoto 84, obteniendo el 59.5%, los homocigotos para T se encontraron 39 obteniendo el 27.6%.

Del SNP rs7584262 se eliminaron 5 muestras del grupo de fracturas, mientras que en el de OP se eliminó una, del grupo controles se obtuvieron buenos resultados de las 141 pacientes. En cuanto a las frecuencias alélicas, se encontró que el alelo C era el más frecuente en todos los grupos con 89.6%, 89.7% y 90.4% en OP, fracturas y cadera respectivamente. En los genotipos, en todos los grupos se observó que el C/C era el

más frecuente, alcanzando el 80% del total en todos, mientras que el T/T fue el menos frecuente obteniendo una paciente en OP y controles, representando el 0.71% de OP y 0.7% de controles mientras que de fracturas fueron 4 pacientes representando el 2.9% (tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para cada SNP en cada grupo estudiado.

Gen	SNP	Genotipo/Alelos	OP	Fracturas	Controles
<b>WNT16</b>	<b>rs3801387</b>		n= 138	n= 139	n= 140
		A/A	89 (64.4%)	81 (58.2%)	82 (58.5%)
		A/G	45 (32.6%)	50 (35.9%)	47 (33.5%)
		G/G	4 (2.89%)	8 (5.75%)	11 (7.8%)
		A	223 (80.2%)	212 (76.3%)	211 (75.4%)
		G	55 (19.8%)	66 (23.7%)	69 (24.6%)
<b>SOX6</b>	<b>rs7108738</b>		n= 141	n= 136	n= 141
		G/G	6 (4.2%)	11 (8%)	6 (4.2%)
		G/T	45 (31.9%)	41 (30.1%)	38 (26.9%)
		T/T	90 (63.8%)	84 (61.7%)	97 (68.7%)
		G	57 (20.2%)	63 (23.2%)	50 (17.7%)
		T	225 (79.8%)	209 (76.8%)	232 (82.3%)
<b>SLIT3</b>	<b>rs10036727</b>		n= 141	n= 140	n= 141
		C/C	38 (26.9%)	22 (15.7%)	18 (12.7%)
		C/T	73 (51.7%)	80 (57.1%)	84 (59.5%)
		T/T	30 (21.2%)	38 (27.1%)	39 (27.6%)
		C	149 (52.8%)	124 (44.3%)	120 (42.6%)
		T	133 (47.2%)	156 (55.7%)	162 (57.4%)
<b>PKDCC</b>	<b>rs7584262</b>		n= 140	n= 136	n= 141
		C/C	112 (80%)	112 (82.3%)	115 (81.5%)
		C/T	27 (19.2%)	20 (14.7%)	25 (17.7%)
		T/T	1 (0.71%)	4 (2.9%)	1 (0.7%)
		C	251 (89.6%)	244 (89.7%)	255 (90.4%)
		T	29 (10.4%)	28 (10.3%)	27 (9.6%)

OP: osteoporosis

Posteriormente se analizó el equilibrio de Hardy Weinberg (HW) el cual es una ecuación matemática utilizada para el cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de frecuencias alélicas, estima la relación entre lo esperado y lo encontrado en cierta población. Los principios establecen que, en ausencia de selección natural, mutación, migración, apareamiento no aleatorio, endogamia, clasificación errónea de alelos, disminución en la tasa de fertilidad y selección favoreciendo heterocigotos, las frecuencias tanto genotípicas como alélicas se mantienen constantes de una generación a la siguiente.

En las muestras analizadas se encontró que en su mayoría se encontraban en equilibrio tal y como se muestra en la tabla 8. Las muestras de los controles del SNP rs10036727 y del SNP rs7584262 del grupo de fracturas, fueron los grupos en los que no se encontró con el equilibrio de HW por lo que sus resultados no son válidos ya que no cumple con alguno de los principios de la teoría.

Tabla 8. Equilibrio de HW de los SNPs estudiados en los grupos de estudio

Gen	SNP		Genotipo			Alelos		P
<b>WNT16</b>	rs3801387		A/A	A/G	G/G	A	G	
		Todos	251	143	24	645	191	
		OP	88	46	5	222	56	1
		Controles	82	47	11	211	69	0.26
		Fractura	81	50	8	212	66	1
			Genotipo			Alelos		
<b>SOX6</b>	rs7108738		T/T	T/G	G/G	T	G	
		Todos	271	124	23	666	170	
		OP	90	45	6	225	57	1
		Controles	97	38	6	232	50	0.38
		Fractura	84	41	11	209	63	0.089
			Genotipo			Alelos		
<b>SLIT3</b>	rs10036727		C/C	C/T	T/T	C	T	
		Todos	78	237	107	393	451	
		OP	38	73	30	149	133	0.74
		Controles	18	84	39	120	162	0.0061
		Fractura	22	80	38	124	156	0.086
			Genotipo			Alelos		
<b>PKDCC</b>	rs7584262		C/C	C/T	T/T	C	T	
		Todos	339	72	6	750	84	
		OP	112	27	1	251	29	1
		Controles	115	25	1	255	27	1
		Fractura	112	20	4	244	28	0.035

OP: osteoporosis

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión, en el cual se incluyeron las variables de edad, IMC, menarca y años post menopausia. Se analizaron cuatro tipos de modelos herencia por cada SNP en cada población, comparando al grupo control

contra las pacientes con osteoporosis y al grupo control contra las pacientes con fractura de cadera secundaria a osteoporosis. No se observa asociación entre el riesgo de padecer ya sea una fractura de cadera secundaria a OP u OP bajo los modelos de herencia analizados (tabla 9)

Tabla 9. Asociación de polimorfismos estudiados con OP y fractura de cadera utilizando los 4 modelos de herencia.

	Genotipo	Fractura vs controles			OP vs controles		
		OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P
<b>rs3801387</b>							
Aditivo	AG	0.833	0.188- 3.7	0.81	4.06	0.873- 18.88	0.74
	GG	0.81	0.174- 3.768	0.788	2.582	0.54- 12.34	235
Dominante	AG- GG	0.988	0.431- 2.265	0.977	1.767	0.92- 3.397	0.088
Recesivo	GG	0.823	0.194- 3.499	0.792	3.395	0.751- 15.337	0.112
Codominante	AG	1.056	0.449- 2.484	0.901	1.394	0.717- 2.711	0.327
<b>rs7108738</b>							
Aditivo	TG	0.234	0.027- 1.998	0.184	0.728	0.13- 4.085	0.718
	GG	0.434	0.049- 3.849	0.454	1.04	0.18- 6.091	0.96
Dominante	TG- GG	0.489	0.201- 1.193	0.116	0.699	0.361- 1.354	0.289
Recesivo	GG	0.296	0.038- 2.337	0.248	0.829	0.152- 4.513	0.828
Codominante	TG	0.595	0.239- 1.482	0.265	0.708	0.36- 1.392	0.317
<b>rs10036727</b>							
Aditivo	CT	1.043	0.29- 3.745	0.949	0.336	0.13- 0.865	0.24
	CC	1.354	0.423- 4.33	0.609	0.529	0.229- 1.222	0.136
Dominante	CT- CC	0.827	0.329- 2.078	0.687	0.527	0.255- 1.091	0.085
Recesivo	CC	1.238	0.407- 3.761	0.707	0.453	0.205- 1.005	0.051
Codominante	CT	0.758	0.328- 1.755	0.518	1.026	0.543- 1.937	0.937
<b>rs7584262</b>							
Aditivo	CT	0.219	0.007- 6.894	0.388	1.875	0.1- 35.31	0.675
	TT	0.154	0.004- 5.556	0.306	1.952	0.097- 39.48	0.663
Dominante	CT- TT	1.201	0.425- 3.396	0.729	0.999	0.456- 2.186	0.997
Recesivo	TT	0.211	0.007- 6.46	0.373	1.888	0.101- 35.441	0.671
Codominante	CT	1.455	0.492- 4.299	0.498	0.953	0.428- 2.124	0.906

OP: osteoporosis. OR: razón de momios (por sus siglas en inglés). IC: intervalo de confianza

Modelo ajustado a las variables de edad, IMC, menarca y años post menopausia.

En la tabla 9 se encuentran ejemplificados los tipos de herencia con el SNP rs10036727, aunque los resultados no sean válidos ya que los controles no se encontraron en equilibrio de HW. Así como las pacientes con fractura con el SNP rs7584262 ya que tampoco ese grupo se encontró en equilibrio de HW.

## **9. Discusión**

La osteoporosis es la enfermedad ósea más común en humanos (Zanker & Duque, 2018) y el riesgo de fracturas aumenta con la edad. Se sabe que en México, el 16% de la población femenina tiene el diagnóstico confirmado de osteoporosis, con lo que estima que 1 de cada 12 presentarán una fractura a lo largo de su vida y el 50% presentarán una segunda (Patiño & Salmerón, 2019). En México, en el 2012, la población mayor de los 50 años rebasaba los 20 millones de habitantes, correspondiente al 18% del total de 113 millones, con la tendencia a la inversión de la pirámide poblacional, se espera que para el año 2050, 50 millones de personas

pertenezcan a ese grupo etario lo que la hace una enfermedad con importancia epidemiológica.

En las guías internacionales, así como en las guías de práctica clínica nacionales, se describen como factores de riesgo la edad, el IMC, la edad de menarca y los años post menopausia, en nuestra investigación, se comprobaron esos datos siendo concordantes con los de las guías mencionadas. El promedio de edad en el grupo de controles es 26 años menor cuando lo comparamos con el grupo de pacientes con fractura de cadera y 12 años menor al compararlo con el grupo de pacientes con diagnóstico de OP, lo cual es estadísticamente significativo y concuerda con los datos ya conocidos de la enfermedad.

En cuanto a los años post menopausia, la investigación comprobó como factor de riesgo tener más años desde la última menstruación tanto para el riesgo de OP como de fractura de cadera secundaria a OP. En tanto al IMC, también se observó que las pacientes con fractura y con OP tenían IMC más bajos que las pacientes del grupo control, tal y como se ha reportado en la literatura como factor de riesgo y protección respectivamente.

La complicación más grave de esta enfermedad son las fracturas, siendo las más frecuentes las vertebrales y las de radios distal, pero siendo las más incapacitantes las de cadera ya que conllevan a mayor tiempo de hospitalización, riesgo de discapacidad permanente y en ocasiones, llevando al individuo a la muerte. La capacidad de detectar las fracturas o el riesgo de padecerlas, daría la pauta para prevenir las mismas, disminuyendo la incidencia y así los costos.

Es bien sabido que la población mexicana representa un reto para este tipo de estudios ya que en México hay una amplia historia de mestizaje y se sabe de distintos grupos étnicos que aún viven en este territorio. Son esos factores los que intervienen en la heterogeneidad y pueden dar falsos positivos o negativos de no aplicarse correctamente un cuestionario de ancestría. Al analizar las frecuencias tanto alélicas como genotípicas, se encontraron similares a las reportadas en la base Ensembl, lo que nos indica que en población mexicana se encuentra la misma proporción de alelos que en la población global.

Al analizar el equilibrio de Hardy Weinberg, se encontró que no se cumplía en el grupo de fracturas y de controles en dos SNPs distintos, ocasionando que estos resultados no fueran útiles para el análisis. Dentro de las causas para que no se cumpla el equilibrio de HW, la literatura describe: errores en la genotipificación generando falsos homocigotos y por ende una deficiencia de heterocigotos, endogamia causada por consanguinidad no detectada en los cuestionarios, poblaciones en las cuales la selección tendió a cierto genotipo, así como errores en la realización de la reacción al repetir muestras o clasificar erróneamente los grupos.

No se observó alguna asociación entre el grupo de pacientes con fracturas y el grupo con diagnóstico de osteoporosis y los SNPs analizados. Se observan distintas tendencias alélicas entre los grupos, sin embargo, corresponden a las reportadas en las bases de datos por lo que no pueden considerarse concluyentes.

El SNP rs3801387 del gen *WNT16* ha sido relacionado previamente a la densidad mineral ósea, regulación del metabolismo ósea y susceptibilidad a fracturas, aunque la variante causal todavía no se encuentra y el efecto de este gen

en las vías aún no está claro. En un estudio realizado por Hendrickx y colaboradores en 2014, mencionan que distintos GWAS independientes asociaron polimorfismos en este gen con la densidad mineral ósea del cuello femoral, columna lumbar y la de todo el cuerpo, la resistencia ósea, el grosor del hueso cortical y el riesgo de fractura. Este equipo realizó sus estudios en hombres daneses, compararon un grupo de pacientes jóvenes con uno de edad más avanzada y observaron que las asociaciones con la DMO se confirmaron en la cohorte de pacientes jóvenes, mencionando que la correlación podría ser con un aumento de masa ósea (Hendrickx, Boudin, Fijałkowski, Leo, & al, 2013).

En 2012, el grupo de García Ibarbia concluyó que los polimorfismos rs2908004 y rs2707466 del gen *WNT16* están relacionados con la DMO en la cadera, así como con fracturas de la misma en pacientes menores de 80 años, respaldando el papel que este gen tiene en la determinación del riesgo de fracturas osteoporóticas (García-Ibarbia, Pérez-Núñez, Olmos, Valero, & al, 2013)

Del gen *SOX6*, el equipo de la doctora Correa- Rodríguez en España, investigaron si el SNP rs7117858 estaba asociado a la

DMO, incluyeron hombres y mujeres en su estudio con un promedio de edad de 20 años. El análisis de regresión lineal realizado, reveló que ese SNP estaba asociado con la medición por ultrasonido de la DMO, demostrando por primera vez que este gen influye en la DMO de adultos jóvenes de ambos sexos, sugiriendo la implicación de este gen en los fenotipos relacionados con la OP durante la edad adulta temprana (Correa-Rodríguez, Schmidt Rio-Valle, & Rueda-Medina, 2018).

El equipo del doctor Velázquez realizó un estudio en el que observaron que SNP en el gen *SOX6* y el SNP rs7584262 del gen *PKDCC* se asocian a DMO en sitios específicos, del primero en el cuello femoral y del segundo principalmente en columna lumbar. Estos genes no han sido asociados a variaciones en la DMO previamente, ni a osteoporosis en población mexicana, en cambio, sí se han visto relacionados en población europea y asiática (Villalobos-Comparán, Jiménez-Ortega, Estrada, Parra-Torres, & al, 2017)

Con el grupo de controles del SNP rs10036727 del gen *SLIT3* deberá ajustarse la muestra para obtener resultados significativos. Dentro de las variables a considerar, están la genotipificación errónea de las muestras, así como un tamaño

de muestra pequeño por lo que se buscará ampliar el grupo de controles para obtener resultados.

La OP es una enfermedad que se considera multifactorial por lo que encontrar polimorfismos asociados es una tarea difícil ya que pueden estar involucrados otros mecanismos en el desarrollo de la enfermedad, los cuales son difíciles de estudiar. Aún falta mucho por dilucidar en cuanto a los genes relacionados con el metabolismo óseo, las vías implicadas y los mecanismos por los cuales una paciente con OP termina con una fractura de cadera.

Se debe tomar en cuenta que los estudios que pretenden asociar los polimorfismos con las fracturas de cadera contienen un número más amplio de casos y controles. Se considerará ampliar la muestra de este estudio para observar con mayor facilidad la varianza en los datos. Se utilizarán los mismos criterios de selección, inclusión y exclusión para cada paciente, así como la obtención del consentimiento informado de cada una de ellas. Se utilizará el mismo protocolo para homogeneizar la técnica y evitar errores en la realización del procedimiento.

## 10. Bibliografía

- Albert, S., & Reddy, S. (2017). Evaluation of Cost Efficacy of Drugs for Treatment of Osteoporosis: a Meta- Analysis. *Endocrine Practice* .
- Alejandro, P., & Constantinescu, F. (2018). A Review of Osteoporosis in the Older Adult: An Update. *Rheum Dis Clin N Am*.
- Alexeeva, L., Burkhardt, P., Christiansen, C., & Cooper, C. (1994). Assesment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. *WHO Technical report series*.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. (2013). ACOG Releases Practice Bulletin on Osteoporosis. *ACOG*.
- Antolín López, B. E., Gómez Herrera, L. G., Ramírez Hurtado, M. E., & Ríos Mejía, D. (2018). Diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. *Guías de Práctica Clínica IMSS*.
- Barrera-Cruz, A., Cano-Perez, E., Gallardo-Wong, I., Mendoza-Salazar, L., & al, e. (2009). Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en el Adulto. *Guía de Práctica Clínica*.
- Batur, P., Rice, S., Barrios, P., & Sikon, A. (2017). Clinical Update: Osteoporosis Management. *Journal of Womens Health*.
- Black, D. M., & Cooper, C. (2000). Epidemiology of Fractures and Assesment of Fracture risk . *Osteoporosis and Metabolic Bone Disease* .

- Brookes, A. (1999). The essence of SNPs. *GENE an International Journal of Genes and Genomes*.
- Brown, J. P., & Fortier, M. (2006). Canadian Consensus Conference on Osteoporosis, 2006 Update. *J Obstet Gynaecol Can*.
- Buck II, D. W., & Dumanian, G. A. (2012). Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. *Plastic and Reconstructive Surgery Journal*.
- Colles, A. (1970). Historical Paper on the Fracture of the Carpal Extremity of the Radius (1814). *The British Journal of Accident Surgery*.
- Correa-Rodríguez, M., Schmidt Rio-Valle, J., & Rueda-Medina, B. (2018). SOX6 rs7117858 polymorphism is associated with osteoporosis and obesity-related phenotypes. *European Journal of Clinical Investigation*.
- Correa-Rodríguez, M., Schmidt Rio-Valle, J., & Rueda-Medina, B. (2018). SOX6 rs7117858 polymorphism is associated with osteoporosis and obesity-related phenotypes.
- Del Castillo, V. (2012). *Genética Médica*. Ciudad de México: El Manual Moderno.
- Dy, P., Smits, P., Silvester, A., Penzo-Méndez, A., & al, e. (2010). Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Dev Biol*.
- García-Ibarbia, C., Pérez-Núñez, M., Olmos, J., Valero, C., & al, e. (2013). Missense polymorphisms of the WNT16 gene are associated with bone mass, hip geometry and fractures. *Osteoporos Int*.
- Gori, F., Lerner, U., Ohlsson, C., & Baron, R. (2015). A new WNT on the bone: WNT16, cortical bone thickness, porosity and fractures. *International Bone & Mineral Society*.
- Hanjun, K., Choi, Y.-J., Lee, Y.-S., Park, S. Y., & al, e. (2018). SLIT3 regulates endochondral ossification by b-catenin

suppression in chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Hendrickx, G., Boudin, E., & Van Hul, W. (2015). A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *NATURE REVIEWS | RHEUMATOLOGY*.

Hendrickx, G., Boudin, E., Fijałkowski, I., Leo, N., & al, e. (2013). Variation in the Kozak sequence of WNT16 results in an increased translation and is associated with osteoporosis related parameters. *Bone*.

Hidalgo- Bravo, A., Parra-Torres, A. Y., Casas-Avila, L., & Jimenez-Ortega, R. F. (2018). Association of RMND1/CCDC170–ESR1 single nucleotide polymorphisms with hip fracture and osteoporosis in postmenopausal women. *Climateric*.

Ibáñez, R. (2003). Técnicas de medida de densidad de masa ósea. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*.

Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* .

Keita I, P. S. (2007). Biology and biomechanics in bone healing. *AO Principles of Fracture Management*.

Kidd, T., Bland, K., & Goodman, C. (1999). Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in *Drosophila*. *Cell*.

Kim, S., & Misra, A. (2007). SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*

Koller, D. L., Zheng, H.-F., Karasik, D., & Yerges-Armstrong, L. (2013). META-ANALYSIS OF GENOME-WIDE STUDIES IDENTIFIES WNT16 AND ESR1 SNPS ASSOCIATED WITH BONE MINERAL DENSITY IN PREMENOPAUSAL WOMEN. *J Bone Miner Res*.

Lane, N. E. (2006). Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.

Lefebvre, V., Behringer, R., & Crombrughe, B. (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the

chondrocyte differentiation pathway. *Journal of the Osteoarthritis Research Society International*.

- Leslie, W. D., Majumdar, S. R., Johansson, L., A, O., & al, e. (2012). High fracture probability with FRAX® usually indicates densitometric osteoporosis: implications for clinical practice. *Osteoporos Int*.
- Li, J., Quanwei, B., Sixu, C., Huayu, L., & al, e. (2016). Different bone remodeling levels of trabecular and cortical bone in response to changes in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mice. *Journal of Orthopaedic Research*.
- Lieben, L., Callewaert, F., & Roger, B. (2009). Bone and Metabolism: A Complex Crosstalk. *Hormone Research*.
- Macias, H., Moran, A., Samara, Y., & Moreno, M. (2011). SLIT/ROBO1 Signaling Suppresses Mammary Branching Morphogenesis by Limiting Basal Cell Number. *Developmental Cell*.
- Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Advances in Clinical Chemistry*.
- Morales-Torres, J., Clark, P., Delezé-Hinojosa, M., & Cons-Molina, F. (2010). Fracture risk assessment in Latin America: is FraxTM an adaptable instrument for the region? *Clin Rheumatol*.
- Movérare-Skrtic, S., Henning, P., Liu, X., Nagano, K., & al, e. (2014). Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nature Medicine*.
- Ohlsson, C., Nilsson, K., Hennin, P., Wu, J., & al, e. (2017). WNT16 overexpression partly protects against glucocorticoid-induced bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Ralston, S., & Ralston, S. (2000). Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *Journal of Endocrinology*.

- Recker, R. (2004). Genetic research in osteoporosis: Where are we? Where should we go next? *J Musculoskel Neuron Interact*.
- Rosales-Aujang, E., Muñoz-Enciso, J. M., & Arias-Ulloa, R. (2014). Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y su relación con factores de riesgo. *Ginecol Obstet Mex*.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., & al, e. (2001). The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation. *Developmental Cell*.
- Styrkarsdottir, U., Halldorsson, B., Gretarsdottir, S., Gudbjartsson, D., & al, e. (2008). Multiple Genetic Loci for Bone Mineral Density and Fractures. *The new england journal of medicine*.
- Urano, T., & Inoue, S. (2014). Genetics of osteoporosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Valdés-Flores, M., Casas-Ávila, L., Falcón-Ramírez, E., & Ponce-de-León-Suárez, V. (2012). Aspectos Genéticos de la Osteoporosis. *Revista de investigación clínica*.
- Villalobos-Comparán, M., Jiménez-Ortega, R., Estrada, K., Parra-Torres, A., & al, e. (2017). A Pilot Genome-Wide Association Study in Postmenopausal Mexican-Mestizo Women Implicates the RMND1/CCDC170 Locus Is Associated with Bone Mineral Density. *International Journal of Genomics*.
- Waterston, R., & McPherson, J. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*.
- Xu, R., Yallowitz, A., Qin, A., Wu, Z., & al, e. (2018). Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss. *Nat Med*.
- Yang, T., Guo, Y., Liu, J., Shen, H., & al, e. (2012). Genetic variants in the SOX6 gene are associated with bone

mineral density in both Caucasian and Chinese populations. *Osteoporos Int.*

Zanker, J., & Duque, G. (2018). Osteoporosis in Older Persons: Old and New Players. *The American Geriatrics Society.*

Zhou, H., Mori, S., Ishizaki, T., & Takahashi, A. (2016). Genetic risk score based on the prevalence of vertebral fracture in Japanese women with osteoporosis. *Bone Reports.*

## Anexo 1. Consentimiento informado

Número de Registro: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Día Mes Año

Sexo 

F	M
---	---

\_\_\_\_\_  
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre (s)

**Carta de consentimiento informado para la participación voluntaria en las investigaciones sobre el análisis de la susceptibilidad genética relacionada con osteoporosis en la población mexicana, que se realiza en el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII, en los siguientes proyectos:**

1. Polimorfismos génicos relacionados con osteoporosis de columna vertebral en mujeres mexicanas. (SALUD- 2003-C01-30) Responsable: Dra. Margarita Valdés Flores.
2. Polimorfismos génicos relacionados con fractura de cadera en mujeres mexicanas. (56/13). Responsable: Dra. Margarita Valdés Flores.
- 3.- Variaciones genéticas relacionadas con fracturas de antebrazo distal en mujeres mexicanas con y sin osteoporosis. Dra. Margarita Valdés Flores y Dr. Alberto Hidalgo.
4. Variaciones en genes de receptores nucleares en mujeres mexicanas con osteoporosis y fractura de cadera (14/16). Responsable Dra. Leonora Casas Avila.

A través de la presente expreso que acepto de forma libre y voluntaria participar en los proyectos de investigación arriba mencionados que se realizan en el Servicio de Genética, piso 3 de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII. del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII.

Se me ha explicado en forma clara y satisfactoria que se trata de una investigación médica cuya importancia radica en el hecho de que en nuestro país el 17% de las mujeres mayores de 50 años tienen osteoporosis y 1 de cada 12 mujeres podrá tener fractura de cadera. El objetivo es conocer si existen diferencias en los genes asociadas con osteoporosis y fracturas, y los resultados obtenidos aumentarán el conocimiento de la enfermedad lo que permitirá, a largo plazo, que se pueda diagnosticar a tiempo o prevenir, además de saber el riesgo hereditario que tiene la población mexicana de padecer osteoporosis. Se me ha informado que mi participación consiste en donar una muestra de sangre (15 ml equivalente a tres cucharadas soperas), a partir de la cual se obtendrá el material genético (ADN) necesario para la investigación. La sangre será obtenida a partir de una punción venosa, la cual puede ocasionar un ligero dolor o provocar un moretón en el sitio de la punción.

Sólo en caso de que usted presentará una fractura por algún accidente y decida atenderse en el Instituto Nacional de Rehabilitación, también se le preguntará si desea donar una muestra de hueso durante la cirugía programada como parte del tratamiento de la fractura, lo cual no afectará el resultado de la cirugía ni de la rehabilitación. Por otra parte, acepto voluntariamente proporcionar la información personal del cuestionario adjunto, misma que será confidencial. Estos procedimientos se me harán una sola ocasión, sin costo, en la cirugía programada y no modificará el tiempo quirúrgico. Posteriormente, de las muestras tomadas del hueso, se obtendrá el material genético (DNA) y se buscarán diferencias genéticas (llamados marcadores genéticos) que sean indicadoras de osteoporosis o fractura, por métodos de laboratorio (llamado genotipificación).

Comprendo que la toma de las muestras no implica riesgos extra o posibles complicaciones diferentes a las explicadas durante el manejo de mi enfermedad. Sin embargo, en caso de ser necesario, el INRLGII se responsabiliza del tratamiento médico cuando los daños lo ameriten, por las complicaciones que