

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

**IMPORTANCIA DEL GEN BONE MORPHOGENETIC
PROTEIN 15 (BMP 15) Y OTROS GENES
PERTENECIENTES A LA RUTA ESTROGÉNICA EN LA
OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA**

ÁNGEL ALEJANDRO SANTALLA HERNÁNDEZ

MAYO 2008

Dr. D. Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que Don Ángel Alejandro Santalla Hernández, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: "IMPORTANCIA DEL GEN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15 (BMP 15) Y OTROS GENES DE LA RUTA ESTROGÉNICA EN LA OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA"; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 8 de Abril de 2008.

Fdo: D. Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara

Dr. D. José Luis Gallo Vallejo, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada y Jefe de Sección del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital universitario “Virgen de las Nieves” de Granada.

CERTIFICA:

Que Don Ángel Alejandro Santalla Hernández, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: “IMPORTANCIA DEL GEN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15 (BMP 15) Y OTROS GENES DE LA RUTA ESTROGÉNICA EN LA OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA”; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 8 de Abril de 2008.

Fdo: D. José Luis Gallo Vallejo

Dr. D. Alberto Salamanca Ballesteros, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada y médico adjunto del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital universitario “Virgen de las Nieves” de Granada.

CERTIFICA:

Que Don Ángel Alejandro Santalla Hernández, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: “IMPORTANCIA DEL GEN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15 (BMP 15) Y OTROS GENES DE LA RUTA ESTROGÉNICA EN LA OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA”; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 8 de Abril de 2008.

Fdo: D. Alberto Salamanca Ballesteros

Este trabajo no ha recibido financiación externa alguna.

El contenido de esta tesis ha sido motivo de dos comunicaciones premiadas elevadas a categoría de ponencia en el XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), un artículo original aceptado para publicación en la revista "Progresos en Obstetricia y Ginecología", otro pendiente de aceptación en la misma revista y un artículo de revisión pendiente de aceptación en la "Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas.

INDICE

1.- Introducción	1
Definición e importancia de la osteoporosis.	6
Patogenia general	7
Factores de riesgo	8
Clasificación	16
Diagnóstico	17
Osteoporosis y genética	20
2.- Objetivos	29
3.- Material y métodos	31
4.- Resultados	41
Estadística descriptiva	41
Inferencia estadística	49
Características epidemiológicas	49
Análisis de polimorfismos genéticos	57
Estudio de interacción génica: análisis digénico	66
5.- Discusión	92
Consideraciones generales	92
Características epidemiológicas asociadas a osteoporosis	95
Análisis de polimorfismos genéticos de la ruta estrogénica	102
Estudios de interacción génica	107
Conclusión	112
6.- Bibliografía	114

INTRODUCCIÓN

1.- DEFINICIÓN

La osteoporosis se define como una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que predispone a una quien la padece a un riesgo aumentado de fractura. Esta definición ha sufrido un proceso de maduración hasta llegar a la actual, que recoge la importancia compartida de dos conceptos: el de cantidad y el de calidad ósea. La cantidad la medimos con la densitometría, y con ella se establecen para la clínica las categorías de pacientes con osteoporosis u osteopenia, por lo que en estos

momentos se están dirigiendo todos los esfuerzos a la mejora del conocimiento y la evaluación de la calidad ósea.

Así pues, la aparición de fracturas osteoporóticas desde un punto de vista fisiopatológico depende de la cantidad de hueso existente, (medido como Índice de densidad mineral ósea (DMO), de la estructura del mismo (microarquitectura) y del equilibrio en su síntesis y degradación (*Turnover*). Estos parámetros se agrupan en la llamada *resistencia ósea*, la cual, junto con las fuerzas incidentes sobre el hueso, determinarán la aparición de fracturas.¹

2.- IMPORTANCIA DE LA OSTEOPOROSIS

2.1.- Magnitud del problema

La osteoporosis postmenopáusica constituye un problema sanitario de primera magnitud debido a su alta prevalencia y al coste sanitario y social de sus manifestaciones clínicas, sobre todo las fracturas.

Se estima que alrededor de 200 millones de personas en el mundo padecen este proceso. Sólo en Europa, Estados Unidos y Canadá, el tratamiento de la enfermedad tiene un coste directo anual de 54.000 millones de dólares, a lo que se debe sumar otros diez mil millones en costes indirectos². Los costes directos de esta patología alcanzaron en Europa los 48000 millones de euros en el año 2000 sólo en gastos hospitalarios, lo cual ha supuesto un incremento del 33% en tres años.³

2.2- Prevalencia de osteoporosis en España

En España la osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más prevalente. Afecta a un 35% de mujeres mayores de 50 años, porcentaje que se eleva a un 52% en las mayores de 70 años. Díaz-Curiel y cols.⁴ situaron en un estudio la prevalencia de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas de entre 70-79 años en un 40% y en las mujeres de entre 60 y 69 años en unos valores de casi el 35%. Cuando, en el mismo estudio, se analizó la prevalencia de la osteoporosis en cuello de fémur, las cifras se situaron en valores del 24,2% en el grupo de 70-79 años.

2.3- Prevalencia de las fracturas osteoporóticas en España

La incidencia anual de fractura de fémur en mujeres de edad superior a 50 años es del 3 por 1000. Además, una de cada 5 mujeres de más de 50 años tiene al menos una fractura vertebral osteoporótica, que se asocia a deterioro de la calidad de vida y a riesgo aumentado de otras fracturas⁴. La incidencia de fractura de antebrazo distal es de casi el doble. Se conoce con el nombre anglosajón de *lifetime risk* al riesgo de padecer una fractura a partir de una cierta edad, generalmente a partir de los 50 años, en el tiempo que le resta de vida a una persona. El cálculo se realiza a partir de la incidencia anual por sexo y edad de cada uno de los eventos mediante fórmulas matemáticas complejas. Cummings y cols.⁵ estimaron el *lifetime risk* de una mujer a los 50 años de padecer una fractura de cadera en un 15,6% y de antebrazo en un 15%, mientras que el riesgo se elevaba a un 32% cuando se trataba de una fractura vertebral. En cuanto a la fractura de cadera, el riesgo aumenta en el varón mientras que en la mujer permanece constante a lo largo de toda la vida. El riesgo de la fractura de Colles declina en la mujer con la edad y el de la fractura vertebral se mantiene alto a lo largo de toda la vida, un 27,9% a partir de los 65 años y un 18,3% a partir de los 80 años.

Los datos epidemiológicos de la fractura vertebral son siempre difíciles de concretar, pues sabemos que tan sólo un 30% de las fracturas vertebrales son sintomáticas y el resto pasan desapercibidas y no llegan a diagnosticarse⁶. Los estudios epidemiológicos como el European Vertebral Osteoporosis Survey (EVOS)⁷ han permitido, mediante la realización sistemática de un estudio radiográfico, realizar una aproximación a la realidad en Europa y específicamente en nuestro país. Naves y cols⁸ publicaron los resultados de una cohorte del estudio EVOS seguida durante 6 años y observaron cómo la incidencia de la fractura vertebral fue 4 veces mayor a la de cadera. En cuanto a las edades de presentación, se confirma que la fractura de Colles se produce alrededor de los 65-67 años y la vertebral de los 73-75 años, mientras que la de cadera presenta la máxima incidencia en los 80-85 años. Todos estos datos reflejan la realidad europea, en la que la fractura vertebral tiene una prevalencia del 12% a los 60 años de edad y se incrementa de forma progresiva según la edad hasta alcanzar el 25% a los 75 años en mujeres y el 17% en varones.

La fractura de cadera representa una de las consecuencias más graves de la osteoporosis por su mortalidad y morbilidad. Al contrario que la fractura vertebral, su incidencia y prevalencia, es más fácil de cuantificar pues siempre requiere de la utilización de recursos hospitalarios, que facilitan su registro. En España, a lo largo de los últimos años, diversos estudios han recogido la incidencia de la fractura femoral en diferentes regiones⁹. En los últimos años parece observarse una tendencia creciente en el número de fracturas, probablemente debido al efecto del envejecimiento de la población¹⁰.

Recientemente, Serra y cols.⁶ han realizado un estudio longitudinal de incidencia obtenido mediante el registro del Ministerio de Sanidad y Consumo de los años 1996 a 1999. Se registraron en ese período un total de 130.414 casos en pacientes mayores de 65 años. Observaron cómo el 89% de los pacientes con fractura de cadera tenían una edad media de 82 años, con una gran variabilidad en la incidencia entre las diversas partes de España pero se aproximaba a los 270 casos por 100.000 habitantes en los varones y a 695 por 100.000 en las mujeres mayores de 64 años.

3.- PATOGENIA GENERAL

La cantidad de masa ósea en un momento dado viene determinada por dos hechos: el “pico de masa ósea” que la persona alcanzó en su juventud y la pérdida que haya sufrido posteriormente. Es necesario analizar, por tanto, los cuatro componentes que intervienen en la aparición de fracturas: pico de masa ósea, pérdida de masa ósea, alteración de la calidad y propensión a las caídas¹¹.

3.1.- Pico de masa ósea

Hoy sabemos que tanto la adquisición de la masa ósea durante la juventud como la pérdida posterior tienen una base poligénica, con una participación porcentual muy pequeña de cada uno de los genes implicados. En conjunto, sin embargo, se considera que aproximadamente un 80% del pico de masa ósea viene determinado genéticamente (heredabilidad), dependiendo el resto de influencias hormonales (esteroides gonadales y hormona de crecimiento) o ambientales, alimentación (especialmente ingesta de calcio) y ejercicio¹².

Hay evidencia consistente de la asociación entre el descenso de la DMO y riesgo de fractura. El pico de masa ósea se encuentra bastante determinado por factores genéticos, como lo demuestra el hecho de que los hijos de mujeres con osteoporosis postmenopáusica (OP) tienen menor masa ósea que los hijos de mujeres sin OP¹³ y la concordancia de masa ósea es mayor en gemelos univitelinos que en bivitelinos¹⁴. Distintos genes, incluyendo el gen del receptor de vitamina D, de estrógenos y de IL-6, han sido estudiados en relación a la masa ósea, sin que se hayan demostrado relaciones claras. Sí parece existir relación con el polimorfismo Sp1 del gen de la cadena alfa-1 del colágeno 1 (COLIA 1), habiéndose demostrado asociación con masa ósea baja e incremento del riesgo de fractura¹⁵. Recientemente se ha descrito una mutación del gen de la proteína 5 relacionada con el receptor de LDL (LRP 5) asociada a masa ósea alta¹⁶.

3.2.- Pérdida de masa ósea

Una vez alcanzado el “pico de masa ósea”, el esqueleto adulto se renueva continuamente por la acción sucesiva y acoplada de los osteoclastos, que destruyen hueso, y de los osteoblastos, que forman hueso nuevo para sustituir al viejo destruido por los osteoclastos. A este proceso se le denomina “remodelado óseo”, tiene lugar en múltiples “unidades de remodelado” de la superficie del hueso y está regulado con precisión, tanto por productos de la circulación general como por factores locales. Entre las hormonas reguladoras destacan la PTH, calcitonina, insulina, GH, vitamina D, glucocorticoides, estrógenos, andrógenos y hormonas tiroideas.

De las moléculas locales, son importantes los factores de crecimiento insulínico, TGF- β , factores de crecimiento fibroblástico, PDGF, y otras citocinas, como IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α y factores estimulantes de colonias (M-CSF)¹⁷.

3.3.- Ciclo del remodelado óseo.

En cada unidad de remodelado, el ciclo comienza con la estimulación de células de estirpe osteoblástica en la médula ósea. La PTH y algunos factores locales (IL-1 y TNF- α) estimulan en estas células en reposo (*lining cells*) la producción de colagenasa, que lleva a cabo la disolución de la matriz ósea, liberándose de ella productos (osteopontina, sialoproteína y fragmentos del colágeno degradado) que activan y atraen a los osteoclastos. Éstos se adhieren a la matriz ósea y forman el “borde en cepillo” por el que realizan la

resorción gracias a la acción especial de la catepsina K, tras la liberación de hidrogeniones al medio. Cuando se ha destruido una cantidad determinada de hueso en la unidad de remodelado, ésta debe ser reemplazada por hueso nuevo, lo que sucede a través de las siguientes fases: a) cese de la actividad osteoclástica; b) atracción de los precursores de osteoblastos a la cavidad resortiva; c) proliferación y diferenciación de los precursores de osteoblastos; d) formación de la matriz ósea y e) cese de la actividad de osteoblastos.¹⁷

El cese de la actividad osteoclástica se produce por el aumento local de productos liberados de la matriz ósea, como Ca, P y TGF- β , interviniendo este último factor también en la quimiotaxis y proliferación de los precursores osteoblásticos. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) activan la diferenciación de los osteoblastos para formar hueso, que posteriormente se mineraliza. Una vez terminada la formación, la superficie del hueso se cubre con osteoblastos muy diferenciados (*lining cells*) en reposo, que se activarán en un ciclo posterior.

Todo nuestro conocimiento sobre el remodelado óseo ha tenido un avance extraordinario con el descubrimiento del sistema RANK-RANKL-OPG^{19,20}, que se considera la vía común a través de la cual actuarán todas las moléculas antes señaladas (hormonas y factores locales) para regular la interacción osteoblasto-osteoclasto y el remodelado óseo. El RANK (Receptor for Activation of Nuclear Factor KB; NF κ B) es un receptor de los osteoclastos, al que se une el RANK-L (ligando de RANK) presente en la membrana de las células de estirpe osteoblástica y del estroma medular. Esta unión estimula la proliferación y actividad de los osteoclastos, inhibiendo su apoptosis.

Por otro lado, los osteoblastos producen un receptor soluble, la osteoprotegerina (OPG), que es capaz de unirse al RANK-L, impidiendo la unión RANK-RANKL, por lo que su acción es inhibidora de la actividad osteoclástica. Es, por tanto, la relación entre RANKL y OPG lo que determina la cantidad de resorción ósea.

El osteoblasto produce, además, el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), que se une al receptor C-Fms de los osteoclastos, siendo también necesario para la osteoclastogénesis y complementario a la acción del sistema RANK-RANKL.¹⁸

Hoy sabemos que la producción de RANKL en los osteoblastos se estimula por la vitamina D (calcitriol), PTH, TNF- α , glucocorticoides, PGE-2, IL-1, IL-11, hormona tiroidea, FGF-2 y IGF-1, entre otros, inhibiendo muchas de estas moléculas la expresión de OPG¹⁹. Los estrógenos, al contrario, inhiben la producción de RANKL y M-CSF y estimulan la producción de OPG y TGF- β por lo tanto globalmente actúan inhibiendo la producción y acción de los osteoclastos. En condiciones normales, la fase de resorción ósea del remodelado dura unas 2 semanas y la formación unos 3 meses. En el adulto joven, la masa ósea se mantiene porque existe un equilibrio entre la actividad de osteoclastos y osteoblastos y la cantidad de hueso formado y destruido es similar. En estas condiciones de normalidad se calcula que al cabo de un año se renueva el 4-5% del hueso cortical y el 25% del hueso trabecular. Cuando este equilibrio se rompe, como ocurre en la OP, por un aumento de actividad osteoclástica con creación de cavidades de resorción más profundas o por fallo de los osteoblastos para rellenar esas cavidades, se produce una pérdida ósea difícilmente recuperable²⁰.

3.4.- Menopausia y masa ósea

Tras la menopausia se produce una situación de alto remodelado óseo, donde coexisten un aumento del número de unidades de remodelado activas con un desequilibrio osteoclasto-osteoblasto, y un incremento de la actividad osteoclástica en cada una de ellas, lo que da lugar a una pérdida acelerada de la matriz ósea. Esta afecta fundamentalmente al hueso trabecular y puede alcanzar un 4-6% a nivel vertebral el segundo año y un 8-13% el tercero después de la menopausia²¹. En conjunto, se atribuye al hipoestrogenismo postmenopáusico la responsabilidad directa de casi la mitad de la pérdida de masa ósea en la mujer a lo largo de la vida, lo que la hace mucho más propensa que el varón a padecer osteoporosis²².

En efecto, se sabe que los estrógenos disminuyen la actividad osteoclástica inhibiendo la producción de M-CSF, RANKL, IL-1, IL-6 y TNF- α , al tiempo que estimulan la producción de OPG y TGF- β , por lo que su déficit tras la menopausia invierte todas estas acciones y condiciona la pérdida acelerada de masa ósea.¹²

La resorción ósea exagerada, a través del calcio que extrae del hueso, tiende a elevar los niveles de calcemia, lo que, a su vez conlleva una disminución de la secreción de PTH y de la producción de 1,25 (OH) 2D3, por lo que disminuye la absorción intestinal y aumenta la eliminación urinaria de calcio, cerrándose el círculo de las alteraciones fisiopatológicas.

3.5.- Masa ósea y edad

Independientemente de la pérdida acelerada de la masa ósea que se produce en la mujer durante los primeros años después de la menopausia, tanto en ella como en el varón se produce una pérdida continua que llega hasta edades muy avanzadas y que está en la base de la osteoporosis senil. En estos cambios, las alteraciones hormonales y de factores locales siguen teniendo un papel importante.

Existe una evidencia creciente de que los niveles de testosterona y estrógenos influyen en la masa ósea del varón y de que la disminución de estos últimos también se correlaciona con la disminución de la masa ósea, como ocurre en la mujer, en el varón de edad avanzada¹⁸.

Aunque los niveles séricos de OPG aumentan con la edad, su producción en médula ósea está disminuida al tiempo que aumenta la producción de RANK-L, lo que puede jugar un papel importante. A esta pérdida contribuye, además, la disminución de la función renal que se produce con la edad, que da lugar al déficit de 1,25, (OH) 2D, y la disminución de la absorción intestinal de calcio, con aumento secundario de PTH.

3.6.- Alteración de la calidad ósea

Los distintos factores que intervienen en la calidad del hueso son la actividad del remodelado, la porosidad cortical, la mineralización secundaria, el estado de los enlaces de colágeno, la pérdida de conectividad trabecular y la acumulación de microlesiones.

Interesa recordar aquí que los distintos elementos que regulan la cantidad de masa ósea también intervienen en la calidad del hueso, siendo importante la genética, la menopausia y la edad. El aumento del remodelado disminuye el grosor de las trabéculas y produce pérdida de conectividad entre las mismas. Ello, junto con la edad, altera los enlaces de colágeno y aumenta las microlesiones, disminuyendo la resistencia ósea²³. Se añaden, además, los

distintos factores de riesgo de OP que a lo largo de la vida de la persona se van sumando para contribuir a una menor cantidad y calidad del hueso

4.- FACTORES DE RIESGO

Al hablar de factores de riesgo asociados a osteoporosis consideramos aquellos atributos, condiciones o estados del sujeto que lo predisponen a padecer la enfermedad o sus consecuencias principalmente la fractura.

Algunos de los factores de riesgo descritos son intrínsecos, y por tanto no modificables, como la edad, el sexo y la raza; otros, por el contrario, son extrínsecos y pueden corregirse, como la dieta o el estilo de vida, las situaciones que incrementan el riesgo de caída o el consumo de determinados fármacos. Además, la concurrencia de varios factores de riesgo en una mujer puede ser tan importante como el valor de la densitometría²⁴ (ver tabla 1) . Otra forma de clasificarlos, también útil en la práctica diaria por su posibilidad de prevención, es dividirlos en factores responsables del aumento de la fragilidad ósea y factores relacionados con las caídas.

Tabla 1. Factores de riesgo de fracturas y nivel de evidencia²⁵

Factores	Riesgo asociado	Riesgo relativo (IC del 95%)	Nivel de evidencia
Factores de riesgo óseo			
≥ 2 fracturas vertebrales previas	Fractura vertebral	11,8 (5,1-22,6)	1b
Descenso DMO* por cada -Δ DE	Fractura de fémur Fractura vertebral	3,8 a 5,8 (2,2-9,5)§ 1,6 (1,3-1,9)	1b
1 ó 2 fracturas vertebrales previas	Fractura vertebral	3,6 (2,5-5,2)	1b
Historia materna fractura fémur	Fractura de fémur	1,8 (1,2-2,7)	1b
Sedentarismo	Fractura de fémur	1,7 (1,2-2,4)	1b
Cualquier fractura a edad > 50 años	Fractura de fémur	1,5 (1,1-2,0)	1b
Edad (cada 5 años)	Fractura de fémur	1,4 (1,2-1,6)	1b
Estatura (a los 25 a., por cada 6 cm)	Fractura de fémur	1,3 (1,1-1,5)	1b
Consumo elevado de proteínas	Fractura de fémur o Fractura de antebrazo	1,22 (1,04-1,43)	1b
Hábito de fumar	Fractura de fémur	1,17 hasta 2,08 (1,05-2,54) según edad	2a
Fractura previa de antebrazo	Fractura de antebrazo	2,58 (1,84-3,72)	2b
Marcadores de remodelado	Fractura de fémur	1,39-2,3	2b
Nivel indetectable estradiol y SHBG	Fractura de fémur Fractura vertebral	6,9 (1,5-32)¥ 7,9 (2,2-28)¥	3b
Factores de riesgo de caída			
Uso prolongado de benzodiazepinas	Fractura de fémur	1,6 (1,1-2,4)	1b
Incapacidad para levantarse de una silla	Fractura de fémur	1,7 (1,1-2,7)	1b
Frecuencia cardíaca > 80 lpm	Fractura de fémur	1,7 (1,1-2,0)	1b
Factores protectores			
Consumo de alcohol, 5 a 7 dosis/semana**	Fractura vertebral	0,65 (0,53-0,99)	2b
Ejercicio físico moderado	Fractura fémur	0,64 (0,47-0,88)	2ª
Ejercicio físico intenso	Fractura fémur	0,64 (0,45-0,89)	2ª

Como ya se ha mencionado, la probabilidad individual de padecer una fractura osteoporótica está condicionada por múltiples factores. De hecho, cada localización específica de fractura tiene un perfil de factores de riesgo determinado. Generalmente no actúan de forma aislada, sino que es la combinación de varios de ellos, lo que aumenta significativamente el riesgo de fractura y puede ser útil para seleccionar a individuos a los que realizar una densitometría ósea e incluso para decidir el inicio del tratamiento farmacológico.

4.1 Factores de riesgo no modificables.

4.1.1.- Edad y sexo

El principal marcador de riesgo para la fractura de cadera es la edad, siendo el riesgo un 50% mayor en la mujer que en el varón²⁶. En los distintos estudios existe discordancia en atribuir a la edad un determinado riesgo relativo (RR) de osteoporosis y fractura. En el estudio SOF²⁷ se pudo comprobar que por cada 10 años de incremento en la edad, el riesgo de fractura de cadera aumenta 2,9 veces. En una revisión reciente²⁸ se establece que la probabilidad a 10 años de cualquier fractura osteoporótica (antebrazo, húmero, vertebral o de cadera) aumenta 8 veces en las mujeres y 5 veces en los varones al pasar de los 45 a los 85 años. El riesgo de fractura de cadera aumenta 13 veces entre los 60 y los 80 años, mientras que la DMO desciende sólo lo suficiente como para ser responsable del incremento en el riesgo de fractura al cuádruplo.

La mujer es el grupo poblacional más susceptible de padecer osteoporosis, principalmente en los años cercanos y posteriores a la menopausia. La prevalencia es de 15 ó 20 a 1 respecto al hombre. A partir de los 50 años la tasa de incidencia de fractura de cadera es mayor en la mujer que en el varón en una relación tres a uno²⁹.

4.1.2.- Fractura osteoporótica previa

Independientemente del valor de la DMO medido por DEXA, la presencia de una fractura previa por fragilidad aumenta el riesgo de nuevas fracturas entre 1.5 y 9.5 veces, dependiendo de la edad, del número de fracturas previas y su localización. Así, el riesgo de fractura de cadera se duplica en caso de una fractura previa (de cadera, vertebral o de antebrazo)³⁰. De forma global y para cualquier localización, el riesgo de fractura de un individuo con una fractura osteoporótica previa, es de 2.2 veces mayor que la de un individuo sin dicho antecedente. La presencia de múltiples fracturas previas incrementa aún más el riesgo de fractura subsiguiente. Independientemente del valor de DMO, el riesgo de fractura osteoporótica es doce veces mayor en presencia de dos o más fracturas vertebrales previas. Por tanto, la radiografía vertebral combinada con la determinación de la DMO permite establecer un patrón de riesgo de fractura mejor que el conseguido con cada técnica por separado. Por ejemplo,

una mujer osteoporótica de 50 años tiene el triple de riesgo de fractura de cadera que la población general de su edad. Sin embargo, si además tiene una fractura previa, su riesgo es cinco veces mayor³¹.

4.1.3.- Antecedente familiar de fractura

Este factor se ha relacionado principalmente con la fractura de cadera. Dado que la influencia genética sobre el riesgo de osteoporosis es multifactorial, no sólo debe considerarse el antecedente de fractura de cadera en familiares de sexo femenino (madre y abuela), sino también en familiares varones de primero y segundo grados.

4.2.- Factores de riesgo modificables

4.2.1.- Variables antropométricas

El peso corporal es un importante factor de riesgo de osteoporosis. Varios estudios han señalado que un peso menor o igual a 57 kg se asocia a un mayor riesgo de fractura, especialmente de cadera. Una talla baja también se ha implicado como factor de riesgo de fractura osteoporótica, así como un IMC menor de 19 kg/m². Por otro lado, las mujeres con un menor contenido de grasa corporal presentan una menor DMO³¹.

4.2.2.- Densidad mineral ósea

La DMO es la variable aislada que mejor predice el riesgo de fractura osteoporótica en la mujer posmenopáusica. El riesgo de fractura aumenta aproximadamente al doble por cada desviación estándar de disminución de la DMO medida por DEXA. Este riesgo varía en función de la técnica empleada, de la localización y del tipo de fractura. En el caso de la fractura vertebral, el riesgo aumenta 1.8 veces por cada desviación estándar de disminución de la DMO en el cuello femoral³².

4.2.3.- Índices bioquímicos y riesgo de fractura

Aisladamente, la utilidad de los marcadores bioquímicos de remodelado en la predicción de la pérdida de masa ósea es escasa. Sin embargo, dado que el aumento del recambio, con independencia de su efecto sobre la masa ósea, es por sí mismo un factor de riesgo de fractura, algunos estudios recientes sugieren que una aproximación combinada con DMO y marcadores de recambio (especialmente el CTX en orina) predice mejor el riesgo de fractura

en la mujer posmenopáusica que la simple medición de la DMO. Sin embargo esta sigue siendo una cuestión controvertida.

4.2.4.- Ejercicio físico

El estudio SOF³³ (Study of Osteoporotic Fractures) mostró una asociación significativa entre el nivel de actividad física y la fractura de cadera, aun después de ajustar para otros factores de riesgo conocidos para esta fractura. Así, las mujeres sedentarias tienen de un 20% a un 40% más de riesgo de fractura de cadera que las mujeres que realizan una actividad física ligera (2-4 horas de ejercicio semanales). En un meta-análisis reciente de 18 ensayos clínicos³⁴ se ha puesto de manifiesto que los ejercicios con carga, los ejercicios con resistencia y los aeróbicos son eficaces para incrementar la masa ósea en la columna en las mujeres postmenopáusicas.

4.2.5.- Dieta mediterránea

El término dieta mediterránea fue acuñado en un libro de cocina titulado *How to eat well and stay well, the mediterranean way*, escrito por Ancel y Margaret Keysen en 1950, antes, por tanto de la publicación del clásico estudio de siete países que aportó datos sobre la distribución geográfica de la enfermedad coronaria y su relación con el tipo de dieta. Este estudio, demostró una menor morbilidad cardiovascular en las regiones del área mediterránea Creta, Corfu, Crevalcora, Dalmacia y Monetgiorgio cuya alimentación se basaba en el consumo de aceite de oliva, frutas, cereales, verduras frescas y vino frente a otras regiones (EEUU, Finlandia, Japón..) cuya alimentación se basaba en un alto consumo de cerveza, carne roja, grasas etc. En España los datos de morbi-mortalidad cardiovascular son equiparables a los de otros países de la cuenca mediterránea y menores a los de otros países desarrollados.

Hoy, el concepto de dieta mediterránea se ha ampliado más allá de la alimentación y se usa para referirse a un estilo de vida y cultura común con otros países mediterráneos. Las características principales de la dieta mediterránea son:

- Consumo abundante de alimentos de origen vegetal.
- Consumo de alimentos frescos de temporada.
- Uso de aceite de oliva.
- Ingesta diaria de lácteos y derivados: yogurt y queso.

-Consumo frecuente de pescados, frutos secos y vino.

-Consumo ocasional de carnes rojas, aves y grasas.

Teniendo en cuenta que el pico de masa ósea depende, sobre todo, de factores genéticos y endocrinos, las posibilidades de incrementar la masa ósea son relativamente escasas. Después de la adolescencia, el incremento de la masa ósea es escaso; por ello conviene insistir en la importancia de la dieta en la adolescencia. Los estudios que evaluaron la importancia de la dieta durante el periodo de crecimiento sugieren que una dieta rica en calcio, proteínas y minerales es importante para alcanzar un adecuado pico de masa ósea³⁵. También es beneficiosa una dieta adecuada en la edad adulta y en la premenopausia. Sin embargo, la dieta rica en calcio en la posmenopausia, para la prevención de fracturas, es un tema todavía controvertido. El suplemento de calcio tiene un pequeño efecto positivo sobre la densidad mineral ósea (DMO), pero no está claro que reduzca la incidencia de fracturas vertebrales -aunque se advierte una tendencia favorable- ni reduce la fractura de cadera³⁶.

Ácidos grasos omega-3, omega-6 y omega-9

Los ácidos grasos saturados no poseen ningún doble enlace. Los insaturados, si tienen un doble enlace, son "monoinsaturados" y, si tienen dos o más, son "poliinsaturados". La denominación de "omega" alude a la posición del doble enlace. Los ácidos grasos esenciales poliinsaturados se agrupan en dos familias: omega-3 y omega-6. Existe mucha evidencia de que la cantidad y el tipo de grasa en la dieta tienen un impacto importante sobre la salud ósea. Según datos tomados del NHANES 111³⁷, la DMO está negativamente asociada con la ingesta de grasas saturadas. Así, una dieta rica en omega-3 y omega-6 tiene efectos beneficiosos sobre la masa ósea y, además, está asociada con la disminución de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. En este sentido, muchos científicos creen que es muy importante un equilibrio en la dieta entre omega-3 y omega-6.

Los ácidos grasos omega-3 se encuentran en el aceite de linaza, el aceite de nuez, los huevos, los aceites de pescados, el hígado de bacalao y la caballa, entre otros. El principal componente del aceite de nuez y de linaza es el ácido alfa linolénico, mientras que los ácidos grasos predominantes en los

pescados grasos son los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Los más activos y beneficiosos son el EPA y el DHA.

Los omega-5, por otra parte, se encuentran fundamentalmente en los aceites vegetales -aceite de maíz, soja, girasol y cacahuete-, cuyo componente principal es el ácido linoleico. El aceite de oliva, por último, de cuyas beneficiosas propiedades ya nadie duda, es un omega-9. Es el componente más habitual de grasa alimentaria en la dieta mediterránea.

En los últimos años existe un gran interés por la influencia de las dietas ácidas o base sobre el metabolismo óseo. Varios estudios, como el Framingham Osteoporosis Study³⁸ han demostrado que las dietas con contenido alcalino (magnesio, potasio, frutas y vegetales) mejoran la DMO y detienen la pérdida de masa ósea, a diferencia de las dietas de componente ácido (proteínas).

4.2.6.- Hábitos tóxicos

El tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol se asocian con un aumento del riesgo de OP. Sin embargo, un consumo moderado de alcohol en las mujeres posmenopáusicas puede ayudar a mantener la masa ósea, pues incrementa los estrógenos endógenos y favorece la secreción de calcitonina³⁹ Estos hallazgos necesitan ser contrastados con futuros estudios. En este sentido, deben valorarse siempre los beneficios y riesgos del alcohol y la enfermedad cardiovascular, el cáncer de mama y las fracturas de cadera.

En estudios de experimentación animal, se señalan los hidrocarburos policíclicos aromáticos del alquitrán del tabaco, el benzopireno y el dimetilbenzoantraceno como responsables de la pérdida de masa ósea y de la resistencia ósea⁴⁰. Son numerosos los estudios epidemiológicos que han relacionado el hábito de fumar con el riesgo de OP. Estudios de cohortes y casos y controles en OP posmenopáusica, afirman que dejar de fumar mejora la DMO y disminuye el riesgo de fractura de cadera y vertebral. El estudio EVOS confirmó el efecto adverso del tabaco sobre la DMO⁴¹.

La ingesta de bebidas con cafeína, por otra parte, se asocia de manera inconsistente con una menor DMO. En cuanto al riesgo de fractura, en el estudio SOF³³ se halló una asociación positiva entre el consumo diario de cafeína y el incremento de fractura de cadera.

4.2.7.- Factores de riesgo de caídas

Los datos sobre este tipo de factores proceden en su mayoría de estudios prospectivos como el EPIDOS⁴², el cual confirmó la importancia de alguno de ellos, como los defectos visuales y las alteraciones neuromusculares, en el riesgo de caídas. Estos factores se asocian principalmente con la fractura de cadera y se han descrito entre otros los siguientes:

- Inestabilidad o alteración del equilibrio en la exploración física
- IMC bajo (<19 kg/m²)
- Antecedente de caída reciente (en el último año): una caída lateral incrementa 6 veces el riesgo de fractura de cadera en relación con una caída en otra dirección
- Deterioro cognitivo o demencia
- Uso de sedantes
- Defectos visuales
- Alteraciones neuromusculares: la incapacidad para levantarse de una silla sin ayuda, para estar de pie al menos durante 4 horas al día, o para dar paseos se asocian con un incremento del riesgo.
- Enfermedades o condiciones asociadas con riesgo de caídas: enfermedad de Parkinson, alcoholismo y vértigo, entre otros.

5. CLASIFICACIÓN

5.1.- Osteoporosis involutiva

Es el grupo de osteoporosis más frecuente y al que siempre nos referimos cuando no especificamos otra cosa. Como su nombre indica, se produce con el transcurso de los años, especialmente en la mujer después de la menopausia, entre los 50 y 75 años (OP o tipo I) y tanto en la mujer como en el varón en edades más avanzadas, por encima de los 70 años (osteoporosis senil o tipo II).

5.1.1.- OP o tipo I: se produce en la mujer como consecuencia del cese de la función ovárica; la pérdida ósea se acelera y afecta especialmente al

hueso trabecular, siendo características las fracturas vertebrales por aplastamiento y las de la extremidad distal del antebrazo.

5.1.2.- Osteoporosis senil o tipo II: se produce en ambos sexos, en edades más avanzadas, consecuencia de la pérdida de cantidad y alteración de la calidad ósea que progresivamente tiene lugar con el transcurso de los años. Esta pérdida no es tan acelerada como en el tipo I. Esta división en tipos I y II de la osteoporosis involutiva, aunque útil en la práctica clínica, no se corresponde con dos procesos completamente independientes sino que muestra momentos distintos de un mismo proceso que evoluciona a lo largo de años. Efectivamente, si la mujer no tuviese una pérdida acelerada de masa ósea después de la menopausia, no padecería tan frecuentemente una osteoporosis senil 15 ó 20 años más tarde. Pero, además, sabemos hoy que el déficit estrogénico juega un papel no solamente en la pérdida rápida de masa ósea que sigue a la menopausia sino también en la fase lenta de pérdida que sufren la mujer y el varón en edades más avanzadas⁴³.

5.2.- Osteoporosis secundarias

Utilizamos tal denominación cuando existe una causa capaz de producir el trastorno, independientemente de la menopausia y la edad. Las posibles etiologías son muy numerosas, resaltando diferentes enfermedades endocrinológicas, gastrointestinales, hematológicas o conectivopatías, así como la inmovilización prolongada o el uso de distintos fármacos.

6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de osteoporosis se establece con la realización de una densitometría ósea. El método utilizado más ampliamente es la absorciometría radiológica de doble energía (DEXA), validado como patrón de oro para predecir el riesgo de fractura.

Las zonas de medición más habituales son la columna lumbar y el cuello de fémur. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una definición densitométrica de osteoporosis, considerando su existencia cuando el paciente presenta un valor de DMO en índice T, en columna lumbar o en cuello de fémur, inferior a -2.5 desviaciones estándar.⁴⁴

El valor de DMO lumbar por DXA (Hologic), en mujeres españolas, que representa el pico de masa ósea (referencia para el índice T) es 1.040 ± 0.104 g/cm² (media + DS). Este valor de DMO en cuello femoral por DXA (Hologic), es 0.840 ± 0.109 g/cm².²⁰

Por cada desviación estándar de descenso de la densidad ósea, por diferentes técnicas, el riesgo relativo asociado de fractura oscila entre 1.3 y 3.9 . Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, especialmente los de resorción, en pacientes ancianos, se asocian a incremento de riesgo relativo de fractura.

La prevención constituye una de las medidas fundamentales en el manejo de la osteoporosis. Se recomienda una dieta saludable, con baja cantidad de proteínas, ejercicio físico regular, la ingesta de niveles adecuados de lácteos y derivados y el abandono del hábito tabáquico. Todas estas medidas van encaminadas a conseguir un pico de masa ósea alto premenopáusico⁴⁵. Entre las medidas terapéuticas para la osteoporosis establecida destacan la terapia hormonal sustitutiva (THS), los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM), la tibolona, los bifosfonatos, la calcitonina y la paratohormona.

7. OSTEOPOROSIS Y GENÉTICA

7.1. Contribución de los factores genéticos a la OP.

A la vista de la distribución de la osteoporosis en el ser humano, es lícito afirmar que se trata de un proceso propio del sexo femenino, en tanto sólo uno de cada cuatro afectados es un varón⁴⁶. La protección del hombre se explica por varias razones que no esconden que la Genética ha dejado de cumplir un mero papel secundario: adquiere mayor masa ósea a lo largo de toda su vida, carece del hito de la menopausia, tiene menor tendencia a caerse y su esperanza de vida es más corta.

Partimos pues de diferencias de sexo (en parte connatales) en la adquisición de masa ósea, tal es así que, probablemente hasta el 80 por ciento de la cantidad de hueso que adquiere un individuo esté determinada genéticamente, circunstancia que por si sola condiciona incluso cómo será su

resistencia a la fractura en la vejez⁴⁷. Desde esta perspectiva, la osteoporosis se constituye pues como una enfermedad compleja, con una predisposición adquirida y sujeta a fuertes influencias ambientales perfectamente descritas en los estudios epidemiológicos⁴⁸. En otras palabras, al igual que otros procesos ligados al envejecimiento, la existencia de enfermedad depende de una poderosa interrelación entre *genoma* y *ambio*.

Además, la OP es una enfermedad cuya patogénesis se caracteriza en esencia por un alto remodelado óseo, y los factores que lo regulan tienen también una heredabilidad variable, cercana al 85 por ciento², y que incluye la propia genética de la función ovárica⁴⁹.

La importancia y actualidad de la investigación genética en la OP queda reflejada en las más de mil publicaciones aparecidas desde que se descifró el código genético humano. La identificación del gen o los genes implicados en su desarrollo se ve dificultada, sin embargo, por el carácter multifactorial de la propia enfermedad así como por la heterogeneidad genética de las distintas poblaciones. La carrera por descubrir una alteración genética que desarrollase la OP se inició con el del colágeno tipo 1 (COL1A1), la principal proteína existente en el hueso y cuya mutación determina la aparición de la osteogénesis imperfecta⁵⁰. Por técnicas como el análisis de asociación se han identificado después otros genes candidatos a la osteoporosis en general, siendo los más estudiados, a parte de los del colágeno, el gen que codifica el receptor de la vitamina D (VDR), el de los receptores estrogénicos, el de la interleucina 6, o el del factor de crecimiento transformante Beta⁵¹. Los resultados fueron, en su inicio, prometedores, aunque las publicaciones posteriores no han mostrado toda la consistencia esperada y rebaten la hipótesis que conjetura que un solo marcador genético puede servirnos en la detección de pacientes de riesgo⁵².

Tabla 2 : Principales genes relacionados con la DMO y OP

GEN	LOCALIZACIÓN	NOMBRE
VDR	12q12-14	Receptor vitamina D
ER alfa	6q25	Receptor estrogénico alfa
ER Beta	14q22-24	Receptor estrogénico
COLIA1	17q21-22	Colágeno tipo 1
TGF Beta	19q13	Transforming grow factor
OPG	8q24	Osteoprogesterina
LRP 5	11q13.4	Receptor lipoprot baja densidad
IL-6	7p21	Interleukina 6
MTHFR	1p36	Metilentetrahidrofolato reductasa
CYP 19	15q21	Aromatasa
CTR	7q21	Receptor calcitonina
TNFR2	1p36	Receptor factor de necrosis tumoral
TNF alfa	6p21	Factor de necrosis tumoral
COLIA 2	7q22	Colágeno tipo 1 alfa
AR	Xq11-12	Receptor andrógenos
IGF-1	12q22.24	Fc de crecimiento semejante a insulina

7.2. Formas de investigación en genética y OP

Las estrategias de conocimiento sobre genética y OP utilizadas hasta el momento, se han basado en estudios de asociación, análisis del ligamiento y los estudios de funcionalidad⁵³.

Los **estudios de asociación genética** examinan el genoma de individuos buscando polimorfismos de un *gen candidato* con el propósito de identificar asociaciones estadísticamente significativas entre el rasgo estudiado y la variante del genoma de los individuos en el estudio. En la actualidad, la mayoría de los estudios de asociación son univariantes, y con ellos se persigue el aislamiento de genes que den lugar a enfermedades, síndromes, rasgos clínicos o efectos adversos a la medicación usada.

Cómo lograr un *gen candidato* se consigue tras un meticuloso proceso donde se mezclan experimentos biológicos o moleculares que revelen su expresión en el hueso, junto con modelos animales donde una mutación vaya asociada a un fenotipo óseo característico. Entre estos últimos se incluyen las mutaciones naturales que en humanos causan enfermedades óseas con herencia mendeliana, los experimentos de sobre-expresión (experiencias transgénicas) y los de bloqueo de la expresión génica (*knock-out*).

Una vez identificado el gen candidato, se localizan las variantes alélicas comunes (polimorfismos genéticos) asociadas con alguna modificación en la función de las proteínas codificadas por dicho gen. Si el polimorfismo no determina variación en la función de gen se llama polimorfismo *anónimo* mientras que aquellos casos donde se altera su función se denominan *polimorfismos funcionales*; y pueden afectar a la región codificante, provocando un cambio en la secuencia de aminoácidos; a la región promotora 5' asociándose a diferencias en la transcripción del ARN; o a la región 3' determinando diferencias en la degradación del ARN mensajero.

Hasta la fecha se han descrito sesenta y dos *genes candidatos* relacionados con la OP, aunque casi la mitad sólo se ha estudiado en una cohorte, quedando sin verificar su importancia en otras poblaciones de estudio, lo que limita su papel determinante en esta enfermedad. Los más estudiados son, como se ha mencionada anteriormente, los del receptor de la vitamina D, los de los receptores para estrógenos y el del colágeno tipo 46.

El **análisis del ligamiento** se realiza en familias o parejas de hermanos en los que mediante marcadores o microsatélites se identifican regiones en cada uno de los cromosomas donde puede estar localizado el gen responsable de la enfermedad o fenotipo que presentan . Es decir, las regiones cromosómicas que contienen los genes que determinan el BMD y microarquitectura ósea. Estas regiones se llaman QTL (quantitative trait loci). Así se han identificado distintas regiones (QTL) importantes como 16p, 1p, 3p, 6p, 10p, 18p, 20p y 22p. De todas ellas destaca la identificación del gen Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP 2) en 20p12⁵⁴.

Estos estudios de análisis de ligamento normalmente empiezan con el estudio de los QTL en ratones con muy baja DMO. El estudio en ratones permite el control de variables ambientales que influyen en el DMO y permite

tener una población amplia de estudio. Por el contrario, existe situaciones en lo que se identifican QTL importantes en ratones que en humanos no tiene significación alguna o simplemente no existen.

A medida que se van descubriendo genes implicados, se empieza a considerar la OP como una enfermedad poligénica modulada por factores ambientales donde la predisposición, la patogenia o la respuesta a los tratamientos depende de la interacción entre diferentes genes o de ellos con factores ambientales, aunque más adelante profundizaremos en este aspecto, caben ahora ejemplos de interacción génica relacionados con la OP entre los genes del receptor de la vitamina VDR y del receptor de estrógenos (ESR), o del gen de la interleukina 6 (IL6) con la respuesta al tratamiento hormonal sustitutivo (THS) o a los suplementos de calcio.

7.3. Polimorfismos genéticos en la ruta estrogénica y su relación con la OP.

Existen dos tipos de receptores para los estrógenos, el alfa o tipo 1 (ESR1) y el beta o tipo 2 (ESR2). Ambos pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, y están distribuidos de forma distinta en casi todos los tejidos del organismo, coincidiendo en algunos de ellos. ESR1 y ESR2 se comportan como reguladores de la transcripción del ADN, así, la asociación del ligando a su receptor promueve su unión a una secuencia específica del ADN denominada elemento de respuesta a estrógeno (ERE), que se localiza en las regiones promotoras de los genes diana. Dicha regulación también puede estar mediada por una interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear kappa B (NFkB) o el factor específico de promotor tipo 1 (Sp1)⁵⁵. A los ERE se unen una serie de proteínas coreguladoras llamadas proteínas de interacción con receptores nucleares (NRIP1), capaces de activar o reprimir la transcripción. Los trabajos que en la actualidad relacionan de una manera independiente las variantes genéticas de ESR1 y ESR2, junto a las observaciones de los estudios de interacción, confirma el relevante papel que juegan ambos receptores en las enfermedades relacionadas con los estrógenos⁵⁶. Lo cual es lógico si pensamos que los niveles estrogénicos siguen un proceso de regulación muy

fino, de manera que una pequeña alteración en cualquiera de sus receptores podría modificar el proceso de señalización y dar lugar a un fallo en su función metabólica. Sobre estos genes y otros relacionados con su metabolismo se empiezan a aislar polimorfismos relacionados con enfermedades propias de la mujer, como la OP.

7.3.1. Polimorfismos de los genes del ESR 1 y del ESR2

Los genes para los ESR1 y ESR2 se expresan en los osteoblastos, los osteoclastos y las células estromales (ver Figura 1) Parece que el ESR1 es el principal receptor que media la acción estrogénica en el hueso y tiene una importancia primordial en la regulación de su remodelado. La acción del ESR2, si bien menos conocida, se ha identificado sobre todo en el hueso trabecular⁵⁷.

7.3.1.1. Polimorfismos del ESR1

El gen del ESR1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6q25, está formado por 8 exones y 7 intrones, y en su estructura se han descrito varios lugares sobre los que asientan distintos polimorfismos, los más importantes en las regiones promotoras, las que determinan el inicio de su transcripción. La mayoría de los estudios se han dirigido a tres polimorfismos: el Pvull (T397C), el Xbal (C351G) del intrón 1, y el VNTR (TA)_n⁵⁸ (Figura1) En relación a la osteoporosis, en una población de 2.230 pacientes japonesas se observó que en las mayores de 60 años, el marcador Xbal por si sólo o en combinación con Pvull estaba significativamente asociado con la DMO de cuello femoral⁵⁹. También en un estudio de ocho marcadores dentro del gen *ESR1* en 405 núcleos familiares (1.873 sujetos), se encontraron efectos marginales en la DMO femoral con los marcadores rs932477 y rs2228480⁶⁰. Estos mismos autores observaron una asociación entre un haplotipo formado por siete marcadores y la DMO lumbar.

La asociación de Pvull, Xball y las repeticiones (TA)_n en 2.042 fue estudiada en mujeres alemanas ancianas y observaron que las mujeres homocigotas para el haplotipo px junto con un bajo número de repeticiones (TA)_n, tuvieron una menor DMO lumbar y una disminución en el área de hueso vertebral, junto con un incremento del riesgo a fractura vertebral⁶¹.

Por otro lado, en un metanálisis realizado en 2002, se observó que el homocigoto XX del marcador Xball presentaba una mayor DMO y un menor

riesgo de fractura que las portadoras del alelo x, mientras que el polimorfismo PvuII no estaba asociado en estas pacientes⁶². Recientemente, otro metanálisis de los marcadores PvuII, XbaI y (TA)_n con la DMO y fractura en 18.917 individuos de ocho centros investigadores europeos en el estudio GENOMOS, confirmaron que el genotipo XX de XbaI confiere protección frente al riesgo de fractura¹⁶.

La importancia que tiene el gen *ESR1* en relación con la osteoporosis también ha quedado de manifiesto en el estudio Framingham realizado con la tecnología Affrimetrix 100K en 1.141 individuos, donde observaron dos marcadores (rs1884052 y rs3778099) de dicho gen como candidatos para la susceptibilidad a osteoporosis⁶³.

7.3.1.2. Polimorfismos del gen del *ESR2*

El gen que codifica el *ESR2* en humanos se localiza en el cromosoma 14, en la región 14q23.2. Tiene 9 exones y su secuencia genómica comprende alrededor de 61,2 Kb. (Figura 1). El primer polimorfismo en *ESR2* no fue caracterizado hasta 1998 en población japonesa y consistía en una repetición dinucleótida (CA)_n altamente polimórfica en el intrón 5⁶⁴. Es por ello que en la actualidad, no existen muchos trabajos que relacionan el gen *ESR2* con enfermedades ginecológicas.

En el año 2001, se describieron dos polimorfismos (RsaI y AluI) incluidos en dicho gen en mujeres chinas con disfunción ovárica⁶⁵. Asimismo, se han estudiado polimorfismos de *ESR2* en pacientes diagnosticadas con endometriosis con resultados contradictorios^{66 67}.

Los principales estudios realizados en el gen *ESR2* han sido realizados precisamente en OP. Las mujeres posmenopáusicas japonesas que poseen al menos un alelo con 26 repeticiones de la variante (CA)_n tuvieron significativamente mayor DMO lumbar comparadas con las no portadoras de este alelo⁶⁸ (Ogawa y cols., 2000). Además, otros dos estudios han confirmado la asociación entre el polimorfismo de la repetición (CA)_n y la DMO⁶⁹. Un análisis reciente del estudio Framingham confirmó la asociación existente entre el número de repeticiones (CA)_n y la DMO femoral, además de una asociación de dos polimorfismos intrónicos (rs1256031 y rs1256059) incluidos en dicho gen con la DMO femoral en hombres, pero no en mujeres⁷⁰.

7.3.3. Polimorfismos del gen del Receptor de FSH (FSHR)

El receptor para la FSH (FSHR) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y se encuentra localizado en el cromosoma 2, en la región 2p16.3. (ver Figura 2)

La primera mutación encontrada en el gen FSHR en humanos fue descrita en 1995 en población finlandesa y consistía en un cambio de aminoácido (A189V), asociado a amenorrea primaria. Posteriormente se encontraron otras mutaciones (I160T, R573C, D224V, L601V, I191L, A189V y A419T) en casos esporádicos de amenorrea⁷¹.

Los polimorfismos del gen del receptor de la FSH (FSHR) que determinan una hipofunción de este receptor se acompañan de una menor pérdida de masa ósea en ratonas castradas, lo que sugiere que el exceso de expresión de este gen pueda estar detrás del remodelado óseo aumentado tras la menopausia⁷².

7.3.4. Polimorfismos del gen de la aromatasa (CYP19A1)

El gen CYP19A1 se encuentra localizado en el cromosoma 15, en la región 15q21 (ver Figura 3) y codifica una enzima de la familia de la citocromo p450, encargada de catalizar la transformación (*aromatización*) de los andrógenos en estrógenos. A parte de expresarse en órganos sexuales como el ovario, el testículo o la placenta, también se produce en otros lugares, fundamentalmente el tejido adiposo, fuente principal de los estrógenos tras la menopausia.

Masi y cols fueron los primeros que encontraron una asociación entre el polimorfismo (TTTA)_n y la DMO, ya que en un trabajo realizado en población italiana, donde las mujeres con un bajo número de repeticiones (TTTA)_n, mostraban un menor valor de DMO y una mayor incidencia de fracturas que el resto⁷³. Estos resultados, sin embargo, no han sido confirmados en estudios independientes, y se han identificado otros marcadores diferentes asociados de forma variable con la OP⁷⁴.

7.3.5. Polimorfismos de otros genes candidatos en la ruta estrogénica.

Puesto que serán motivo del presente estudio, mencionaremos dos nuevos genes candidatos en las enfermedades relacionadas con los

estrógenos, uno es el gen del NRIP que, como se ha apuntado más arriba es una proteína que regula la transcripción interaccionando con los receptores nucleares de los estrógenos.

Otro gen candidato es el del BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), localizado en el cromosoma X, en la región Xp11.2.(Figura 5) Se sintetiza en el ovocito en forma de pre-pro-hormona y se procesa por una endopeptidasa a prohormona para más tarde adquirir su configuración tridimensional con la que se une al receptor. Pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes Beta (TGF-B), junto con el GDF9 (growth differentiation factor 9). Tanto BMP15 como GDF9 se unen a dos tipos de receptores transmembrana localizados en las células de la granulosa: el receptor de BMP tipo II (BMPRII), y el receptor de BMP tipo IB (BMPRIB). Interviene en la producción estrogénica mediante varios mecanismos: estimulando la proliferación de las células de la granulosa, inhibiendo la expresión del FSHR y estimulando al factor de desarrollo folicular KL (KIT Ligand).

Figura 1.

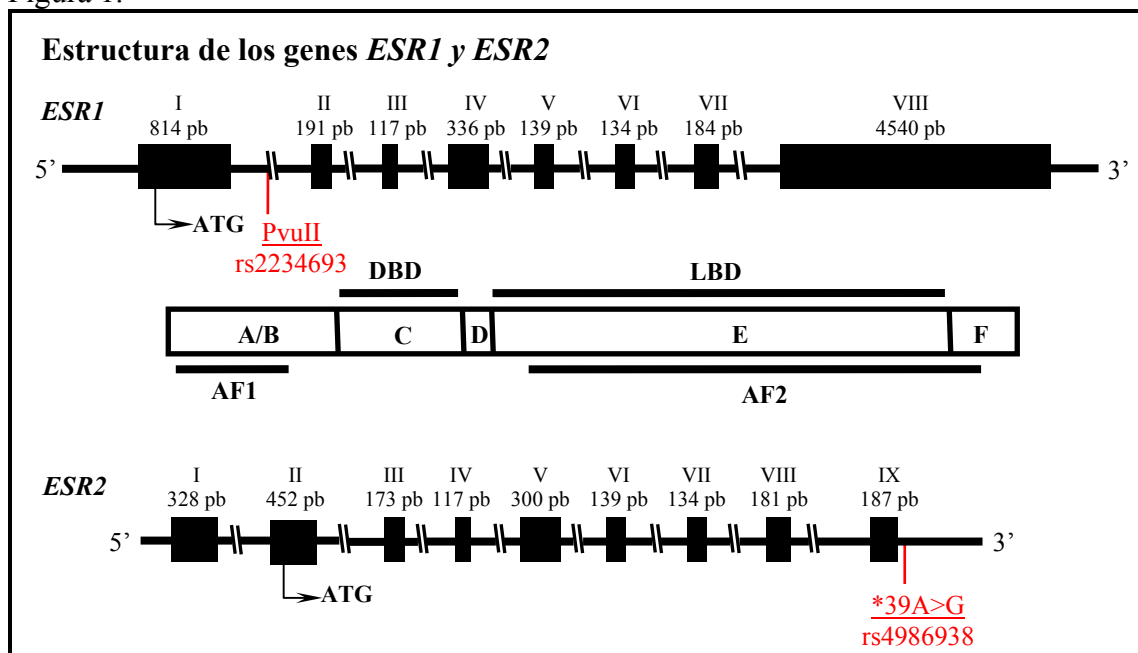


Figura 2.

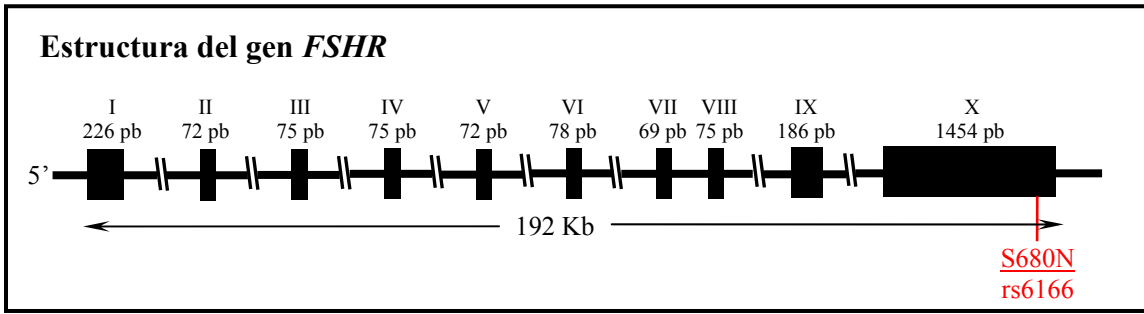


Figura 3.

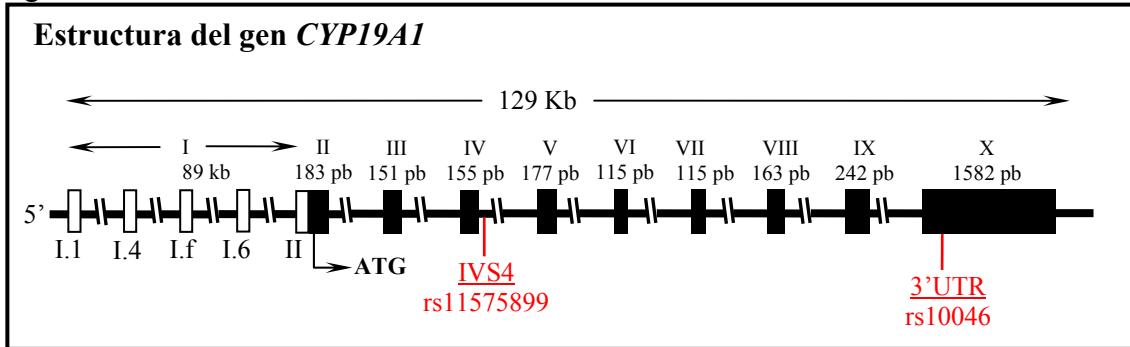


Figura 4.

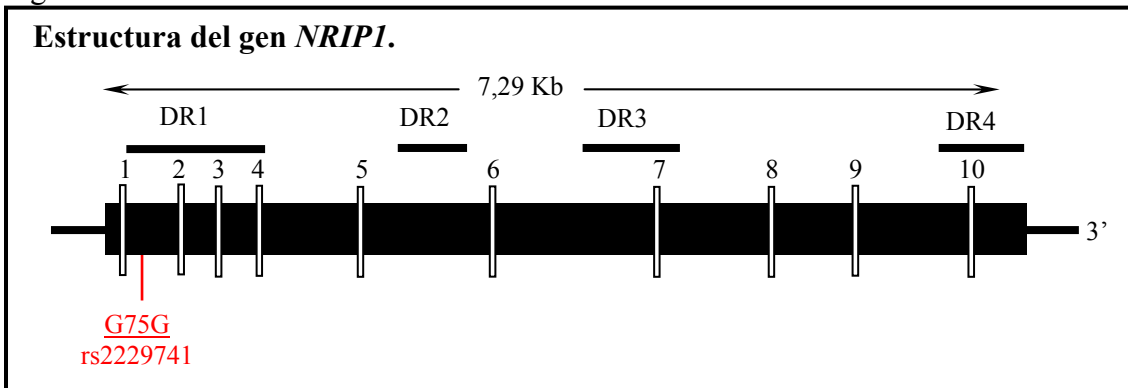
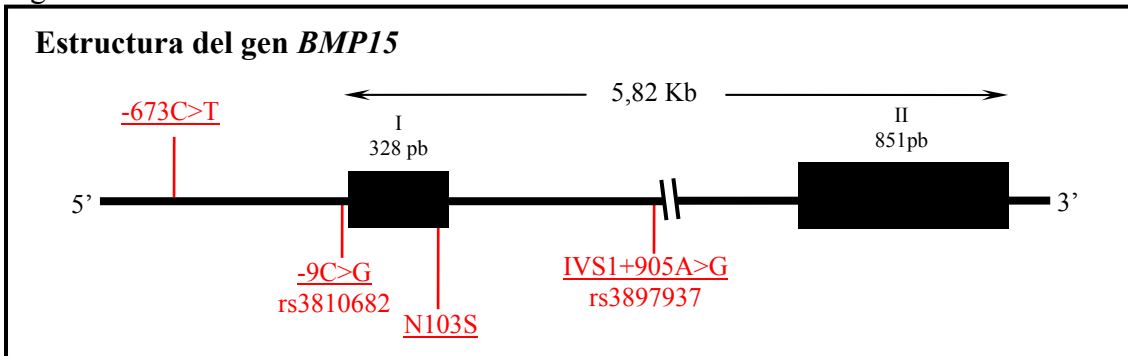


Figura 5.



7.4. Estudios de interacción génica y ambiental

De una manera individual, las diferentes variantes genéticas de los loci ESR1 y ESR2 han sido estudiadas en una gran cantidad de enfermedades relacionadas con los estrógenos, incluida la OP. No obstante, los resultados son muy variados y controvertidos, debido acaso a la falta de poder estadístico en el análisis genético, al empleo de diferentes valoraciones clínicas o a la presencia de estratificación genética. Además, los estudios univariantes ignoran por completo la naturaleza compleja de esta enfermedad y la interacción de las diferentes variaciones genéticas entre si y con los factores ambientales.

Para realizar estudios en modelos de naturaleza poligénica, es necesario desarrollar antes un análisis de interacción entre genes en la OP. Siguiendo esta dirección, se han observado interacciones génicas entre los loci FSHR, ESR1 y ESR2 en otros procesos ginecológicos^{75 76}, trabajos pioneros en describir la asociación de estos dos genes o en mencionar los polimorfismos del ESR2 en enfermedades relacionadas con los estrógenos.

Diferentes grupos investigadores han observado esta interacción génica entre distintos loci en relación con la DMO, como la interacción del gen del VDR con CYP19A1⁷⁷ o con ESR1⁷⁸. También la interacción *CYP19A1-ESR1* descrita por el grupo investigador de Riancho en población española^{79 80}. Además, las combinaciones digénicas *ESR1-VDR* y *ESR1-ESR2* aparecieron relacionadas con la edad de menarquia en población china⁸¹.

Otra faceta de la interacción génica es la búsqueda de variantes génicas que identifiquen pacientes en donde el tratamiento pueda provocar efectos secundarios o donde se pierda la eficacia observada en otras poblaciones, esto es, buscar la efectividad y la eficiencia en la actitud terapéutica⁸². Existen pocos estudios de esta índole, pero parece existir asociación entre determinados polimorfismos del VDR y la absorción de calcio⁸³ o de los ESR con la respuesta al THS en mujeres postmenopáusicas⁸⁴

Aún cuando nos hallamos en fases preliminares, la Genética está entrando en la práctica clínica de la OP en dos facetas principales: la primera hace referencia a la Identificación de mujeres con riesgo de padecer una fractura osteoporótica, en cuyo caso quedará habilitada la *Medicina Predictiva*.

Previniendo cómo puede ser la respuesta a un tratamiento determinado, los análisis genotípicos pueden identificar a las pacientes proclives a responder mal o a sufrir efectos no deseados. Es el argumento en el que se fundamenta la *Medicina Individualizada*.

OBJETIVOS

La correcta y precoz identificación de mujeres con riesgo de padecer una fractura osteoporótica supondría un avance decisivo para intentar minimizar las consecuencias físicas, laborales y económicas de esta dolencia. Se han publicado estudios donde la DMO, el parámetro que actualmente más se utiliza para pronosticar el riesgo de fractura e indicar su tratamiento médico, no siempre se encuentra en los niveles de osteoporosis cuando se presenta una fractura. En otras palabras, aparecieron fracturas en mujeres con DMO normal u osteopénicas y que, precisamente por dicho motivo, habían escapado del tratamiento⁸⁵.

Estos datos, son el motivo de la búsqueda de nuevos valores que nos anuncien ese peligro, en cuya dirección se han orientado, entre otros, los estudios genéticos. Recordemos que la *heredabilidad*, tanto en la adquisición como en la pérdida de la masa ósea, es superior al 75 por ciento, por lo que parece adecuado profundizar en el campo de la *Genómica* para encontrar estos nuevos marcadores de riesgo de la OP y de la fractura.

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Evaluar la relación entre la presencia de polimorfismos genéticos en la ruta metabólica de los estrógenos con el desarrollo de OP en nuestra población.
2. Determinar si esa relación es monogénica o si existen interacciones entre genes.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

3. Mostrar las características epidemiológicas de una población de mujeres postmenopáusicas de nuestro entorno con osteopenia u osteoporosis.
4. Señalar si los factores de riesgo conocidos de Osteoporosis postmenopáusica se presentan en nuestras pacientes.
5. Establecer si existe una relación proporcional entre la magnitud del factor de riesgo y la gravedad de la osteopenia/osteoporosis, medida en valores densitométricos .
6. Señalar si existen otros factores de riesgo higiénico-dietéticos o características médico-sociales relacionadas con la osteoporosis

postmenopáusica que no hayan sido notificados en otros estudios epidemiológicos.

7. Establecer si existe una relación proporcional entre la magnitud de estos nuevos factores de riesgo y la gravedad de la osteopenia/osteoporosis, medida en valores densitométricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio corresponde a 1695 mujeres posmenopáusicas incluidas en un estudio multicéntrico sobre OP y genética donde participaron cinco centros españoles (ver Figura 6). Todas ellas recibieron información detallada sobre el objetivo del estudio, y dieron su consentimiento escrito para participar en él.

Este proyecto recibió la aprobación de los comités éticos de cada hospital involucrado en el estudio.

En todas las participantes se recogió información epidemiológica específica, se obtuvo valor de DMO y se obtuvo sangre periférica para análisis genético.

1.1 Criterios de inclusión:

Pacientes postmenopáusicas de cualquier edad que acudieron a las consultas de ginecología en cualquiera de los centros participantes.

1.2 Criterios de exclusión:

Pacientes premenopáusicas.

Pacientes que no cumplimentasen en su totalidad el cuestionario o cuya información densitométrica o genética no fuese obtenida por cualquier causa.

Para los estudios de asociación genética, pero no para el análisis descriptivo y de factores de riesgo, se excluyeron del estudio aquellas pacientes que en el momento del estudio estuviesen recibiendo cualquier tipo de tratamiento para la OP.

2. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN

2.1 Recogida de los datos clínicos

Todos los datos clínicos fueron obtenidos usando un cuestionario desarrollado en consenso por los investigadores clínicos implicados en este

estudio multicéntrico (ver Anexo 1). Este cuestionario recoge información específica acerca de factores de riesgo ya conocidos para osteoporosis (como edad, peso, hábito tabáquico etcétera) así como otros sometidos a estudio. La validez de la población seleccionada y del proceso de recogida de datos queda probada por la coincidencia encontrada entre la importancia de los factores de riesgo ya conocidos en nuestra población y los publicados en la bibliografía general.

2.2 Obtención de la DMO

En esta población, la densidad mineral ósea (DMO) ha sido medida usando diferentes técnicas densitométricas. La mayoría de los valores de DMO (72.6%) fueron tomados por absorciometría de doble energía de rayos-x (Hologic QDR 1000/W) y el resto de los valores fueron obtenidos usando un densitómetro Norland. Estos valores se utilizaron para calcular el T score lumbar (total de L2 a L4) y femoral (cuello de fémur), que se basa en tomar como referencia el número de desviaciones estándar (SD) respecto a la media de la densidad ósea correspondiente a mujeres de 35 años. Se considera que el valor normal de T score, no indicativo de osteopenia u osteoporosis, es de -1 SD o mayor, mientras que valores menores (mayores en valor absoluto) son indicativos ya de osteopenia o de distintos grados de osteoporosis. Los valores de DMO se estandarizaron empleando tablas de referencia internacionales (Genant y cols., 1994).

2.3 Extracción del ADN

Extraemos ADN genómico de leucocitos en 5 ml de sangre periférica, en un MagNa Pure LC (Roche Diagnostics), utilizando el kit de extracción MagNa Pure LC DNA Isolation kit (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs), se preparan alícuotas de ADN a una concentración de 5 ng/ μ l y el resto del stock se almacena a -20°C .

A continuación se realiza la amplificación de la cadena de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (técnica PCR) y uso de cebadores específicos diseñados por Neocodex® para la detección específica de los genes a estudio mediante la utilización de los programas Oligo y GeneFisher (disponibles en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>).

3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico SSPS 15.0. Para el estudio de las variables cuantitativas en los tres grupos se uso el test de análisis de la varianza (ANOVA) usando el test de Bonferroni o T3 de Dunnett en función de que las varianzas fuesen iguales o diferentes. El estudio de las variables cualitativas se realizó mediante la confección de tablas de contingencia con análisis mediante el estadístico T de Student de las mismas.

En el análisis de la interacción digénica como factor de riesgo de osteoporosis en nuestra población hemos excluido del mismo el grupo de pacientes osteopénicas considerando únicamente pacientes sanas y pacientes con osteoporosis. El test estadístico utilizado para evaluar la interacción digénica es la realización de regresiones logísticas binarias en las que las dotaciones de ambos genes actúan como covariables. En el estudio de esta relación se considera la influencia de otras variables con asociación conocida al desarrollo de enfermedad que pudieran condicionar los resultados como el hábito tabáquico, dieta u otras mediante su inclusión en el test estadístico. Para estimar la frecuencia de los marcadores genéticos analizados en la población general y descartar la sobreexpresión de los mismos en la población menopáusica, se analizó la frecuencia de los mismos en un población control de todas las edades procedente del mismo ámbito geográfico. Para la identificación de interacciones gen-gen hemos empleado diferentes módulos del programa SPSS, realizando un análisis chi-cuadrado con 1 gl en cada una de las posible combinaciones de cada estrato y posteriormente descartamos las interacciones que no fueran estadísticamente significativas (según el Test de Breslow-Day o Test de Homogeneidad de OR), que explicaría que la interacción no es debida al efecto de uno de los estratos por sí sólo, lo que describiremos como “fenómeno de arrastre”.

4.- EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW)

En primer lugar, es necesario conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados en la población en estudio. En una población, las proporciones relativas de los diferentes genotipos se mantienen constantes de una generación a otra, asegurando así la diversidad. Esto se conoce como equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Fue formulado de manera independiente por el matemático inglés G.H. Hardy y el médico alemán W. Weinberg en 1908, siendo uno de los principios más importantes de la genética humana. Para que esta ley se cumpla, son requisitos imprescindibles la panmixia (uniones al azar) y la ausencia de influencias externas, es decir, la ausencia de presión selectiva. Otros factores que pueden alterar el EHW son la aparición de nuevas mutaciones, los movimientos migratorios o la deriva génica (enriquecimiento de la frecuencia de uno de los alelos debido a aislamiento de la población o bien, a una fluctuación estadística aleatoria en poblaciones pequeñas).

La determinación del cumplimiento de este principio se usa comúnmente como control de calidad de la genotipación en individuos no relacionados (Gomes y cols., 1999). La manera más habitual de hacerlo es mediante un análisis de bondad de ajuste chi-cuadrado (*goodnes-of-fit* χ^2). La hipótesis nula es que los alelos son elegidos al azar, cumpliéndose de esta manera las proporciones esperadas según este principio ($p^2 + q^2 + 2pq = 1$). Este test tiene $k(k-1)/2$ grados de libertad (gl) siendo k el número de alelos posibles en el locus en estudio. Puesto que casi todos los marcadores analizados en esta tesis doctoral son dialélicos, estos estudios presentan 1 gl. Para la realización de esta prueba, hemos utilizado las herramientas bioinformáticas del Instituto de Genética Humana de Munich, Alemania, programadas por Tim M. Strom y Thomas F. Weinker (disponibles en <http://ihg.gsf.de>).

En nuestro estudio podemos observar que las frecuencias genotípicas de los diez marcadores mantienen el EHW:

Tabla I. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en nuestra población.

Gen	Marcador	Genotipo 11*	Genotipo 12**	Genotipo 22***	P (EHW)*
FSHR	S680N	225	334	130	0,76
ESR1	Pvull	187	338	154	1,00
ESR2	39A>G****	247	323	118	0,48
NRIP1	G75G	201	356	132	0,28
CYP19	3'UTR	294	541	254	0,86
	IVS4	449	498	142	0,84
BMP15	-673C>T	708	333	47	0,34
	-9C>G	708	333	47	0,34
	IVS1+905A>G	587	423	79	0,82
	N103S	987	99	2	1,00

*11= genotipo en homocigosis más frecuente, **12= genotipo heterocigoto,

22=Genotipo homocigoto menos frecuente. *Tests exacto

5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

5.1 Variables epidemiológicas

Edad: Esta variable hace referencia a la edad de la paciente en años en el momento de su participación en el estudio.

Peso: Peso en kilogramos de la paciente en el momento del estudio.

Talla: Altura en centímetros de la paciente en el momento de participación en el estudio.

Edad de la menarquia: Edad en años de aparición de la primera menstruación en la paciente.

Edad de la menopausia: Edad en años del cese de la menstruación.

Causa de la menopausia: Variable cualitativa que recoge la naturaleza quirúrgica (o iatrogénica) o natural de la menopausia.

Fumador: Variable cualitativa dicotómica que recoge la presencia o ausencia de éste hábito toxico en la paciente en el momento del estudio. Se define a la paciente como fumadora si consume cualquier cantidad de tabaco.

Bebedor: Variable cuantitativa que recoge la ingesta de bebidas alcohólicas a lo largo de una semana en la paciente en el momento del estudio.

Consumo de verdura: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de verdura de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de Pescado: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de pescado de cualquier tipo consumidas a la semana por la paciente.

Consumo de lácteos: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de leche y / o derivados de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de carne roja: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de carne roja de cualquier tipo consumidas a la semana por la paciente.

Consumo de cereales: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de cereales de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de conservas: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de conservas de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Actividad física: Variable cualitativa que recoge el tipo de ejercicio físico que realiza la paciente. Se establecen 3 categorías en función de la intensidad del mismo: sedentarismo, sólo el ejercicio físico propio de las tareas domésticas, practica deporte regularmente.

Número de días de ejercicio físico: Variable cuantitativa que recoge el número medio de días de ejercicio físico que realiza la paciente a la semana.

Tipo de distribución grasa: Variable cualitativa que recoge el patrón de distribución grasa de la paciente en androide (predominio en región abdominal), ginecoide (predominio en región glútea y miembros inferiores) o ninguna en particular (si no destaca ninguna de las distribuciones).

Sintomatología menopáusica vasomotora: Variable cualitativa que recoge la existencia e intensidad de sintomatología menopáusica de tipo vasomotor en el momento actual en la paciente. Se define la misma como: ausente, presente de intensidad leve, presente de intensidad moderada o grave.

Sintomatología menopáusica sexual: Variable cualitativa que recoge la existencia e intensidad de sintomatología menopáusica de tipo sexual en el momento actual en la paciente. Se define la misma como: ausente, presente de intensidad leve, presente de intensidad moderada o grave.

Sintomatología menopáusica psíquica: Variable cualitativa que recoge la existencia e intensidad de sintomatología menopáusica de tipo psíquico en el momento actual en la paciente. Se define la misma como: ausente, presente de intensidad leve, presente de intensidad moderada o grave.

Sintomatología menopáusica dolor osteoarticular: Variable cualitativa que recoge la existencia e intensidad de sintomatología menopáusica de tipo de dolor osteoarticular en el momento actual en la paciente. Se define la misma como: ausente, presente de intensidad leve, presente de intensidad moderada o grave.

5.2 Variables genéticas

Se define un polimorfismo de un gen como una variación en la secuencia de ADN de ese gen. Estas variaciones en la mayoría de las ocasiones no tienen repercusión fenotípica porque no afectan a la región codificante del gen. Las variaciones pueden consistir en cambios de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism* o SNP), repeticiones de una secuencia determinada de ADN (*Variable Number of Tandem Repeats* o VNTR) o aparición de secuencias de ADN que son cortadas por nucleasas determinando una transcripción errónea llamados polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Conceptualmente, la diferencia entre un polimorfismo, especialmente un SNP, y una mutación es que el polimorfismo afecta al menos al 1% de la población. Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de estrógenos tipo 1 (ESR1): Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen ESR1. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Citosina-Citosina (CC), Timina-Citosina (TC) y Timina-Timina (TT).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de estrógenos tipo 1 (ESR2): Variable cualitativa que expresa la variación en el

ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen ESR2. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina-asparragina (AA), Guanina-Asparragina (GA) y Guanina-Guanina (GG).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de FSH (FSHR): Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen FSHR. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina- Asparragina (AA), Asparragina-Serina (AS) y Serina-Serina (SS)

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen BMP 15 marcador - IVS1+905 A>G.: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen BMP 15 en la posición 905.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen BMP 15. marcador 9C>G : Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen BMP 15 en la posición 9.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen NRIP1: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen NRIP1. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina-asparragina (AA), Guanina-Asparragina (GA) y Guanina-Guanina (GG).

Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) del gen CYP 19, marcador UTR3´: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen CYP19, marcador UTR3´

Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) del gen CYP 19 marcador IVS4: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen CYP19, marcador IVS4
En este gen se han identificado 3 polimorfismos: 11.00, 12.00 y 13.00

6. DETERMINACIONES GENETICAS

En total se evaluaron diez polimorfismos de los 6 genes candidatos .

Tabla II. Lista de genes y marcadores seleccionados para los diferentes estudios.

Gen	Nombre Completo	Localización Cromosómica	Locus ID	OMIM	Marcador	rs
<i>FSHR</i>	Follicle Stimulating Hormone Receptor	2p16.3	2492	136435	S680N	6166
<i>CYP19A1</i>	Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1	15q21	1588	107910	IVS4 3'UTR	11575899 10046
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	6q25.1	2099	133430	Pvull	2234693
<i>ESR2</i>	Estrogen Receptor 2	14q23.2	2100	601663	*39A>G	4986938
<i>NRIP1</i>	Nuclear Receptor Interacting Protein 1	21q11.2	8204	602490	G75G	2229741
<i>BMP15</i>	Bone Morphogenetic Protein 15	Xp11.2	9210	300247	-673C>T -9C>G N103S IVS1+905A>G	- 3810682 - 3897937

La genotipación se fue haciendo de forma progresiva de manera que el número de pacientes que fueron estudiadas para cada polimorfismo fue el siguiente:

Gen FSHR: 689 pacientes.

Gen ESR1: 679 pacientes.

Gen ESR2: 688 pacientes.

Gen NRIP1: 689 pacientes.

Gen CYP19A1, marcador 3'UTR : 1089 pacientes.

Gen CYP19A1, marcador IVS4 : 1089 pacientes..

Gen BMP15, marcador -9C>G: 1088 pacientes.

Gen BMP15, marcador IVS1+905A>G: 1088 pacientes.

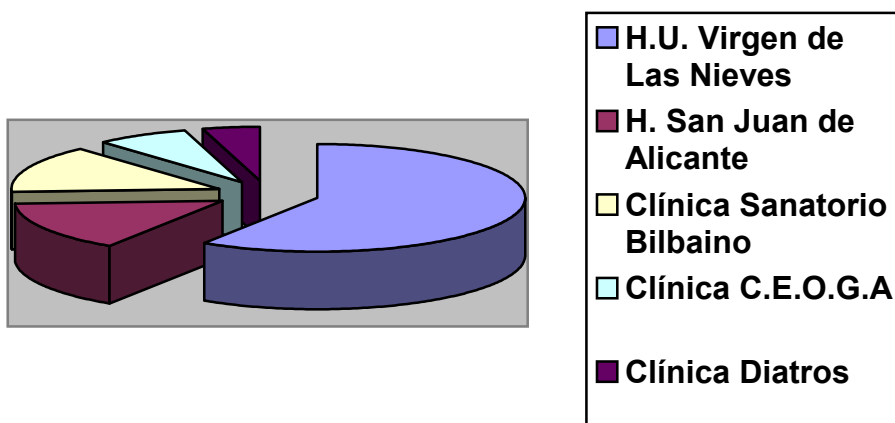
1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1 Origen de las pacientes: (n= 1695)

Tabla III. Origen de las pacientes

	Casos	Porcentaje (%)
Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)	1053	59,2
Hospital San Juan de Alicante (Alicante)	267	15
Clínica Sanatorio Bilbaíno (Bilbao)	249	14
Clínica CEOGA (Lugo)	131	7,4
Clínica Diatros (Barcelona)	79	4,4

Figura 6. Origen de las pacientes.



Características epidemiológicas de la población.

Tabla IV. Variables antropométricas.

N= 1695	Media	Desviación estándar	Varianza	Mínimo	Máximo
Edad	61	8,11	65,77	45	78
Peso	66,29	11,03	112,43	42	120
Talla	157,28	6,23	37,56	138	174
IMC	26,91	5,05	25,50	21,78	39,63

Tabla V. Variables antropométricas (II).

Tipo de distribución grasa	Casos	Porcentaje (%)
Androide	289	16,2
Ginecoide	692	38,9
Ninguna en particular	760	42,7

Tabla VI. Características obstétricas.

n= 1695	Media	Desviación estandar	Varianza	Mínimo	Máximo
Paridad	2,73	1,80	3,22	0	9
Abortos	0,41	0,871	0,70	0	7

Tabla VII. Características de la menarquia y menopausia.

n= 1695	Media	Desviación estándar	Varianza	Mínimo	Máximo
Edad de la menarquia	12,74	1,57	2,49	7	19
Edad de la menopausia	47,44	5,59	30,35	34	60

Tabla VIII. Características de la menopausia.

	Casos	Porcentaje (%)
Tipo de menopausia		
Natural	1347	75,7
Quirúrgica o iatrógena	383	21,6
Menopausia < 45 años	146	8,26
Menopausia < 40 años	446	25,63

Tabla IX. Sintomatología de la menopausia actual.

	Casos	Porcentaje (%)
Sintomatología menopáusica actual general:		
No	729	41
Leves	817	45,9
Intensos	213	12
Sintomatología vasomotora presente	319	17,9
Sintomatología sexual presente	182	10,2
Sintomatología psíquica presente	208	11,7
Sintomatología osteoarticular presente	524	29,5

Tabla X. Sintomatología de la menopausia pasada.

	Casos	Porcentaje (%)
Sintomatología menopáusica pasada general:		
No	430	24,2
Leves	1312	73,7
Intensos	16	0,9
Sintomatología vasomotora pasada	635	35,7
Sintomatología sexual pasada	538	30,2
Sintomatología psíquica pasada	420	23,6
Sintomatología osteoarticular pasada	1162	65,3

Tabla XI. Hábitos tóxicos

	Casos	Porcentaje (%)
Tabaco	516	29
Alcohol	526	29,6

Tabla XII. Ejercicio físico. Frecuencia.

	Media	Desviación estándar	Varianza	Mínimo	Máximo
nº días / semana	4,66	1,99	3,96	0	7

Tabla XIII. Tipo de ejercicio físico.

	Casos	Porcentaje (%)
Ejercicio físico:		
-Sedentarismo (%)	251	14,1
-Propio tareas casa (%)	500	28,1
-Ejercicio regular (%)	1007	5,6

Tabla XIV. Antecedentes familiares y personales

	Casos	Porcentaje (%)
Antecedente materno de osteoporosis	173	9,72
Antecedente materno de cáncer	52	3,3
Antecedente personal de cáncer de mama	42	2,4
Pacientes que dicen tener osteoporosis	544	30,57

Tabla XV. Hábitos dietéticos

	Media	Desviación estándar	Varianza	Mínimo	Máximo
Raciones fruta / día	2.2	1.27	1,41	0	6
Raciones verdura / día	1.48	0.97	0,75	0	5
Raciones lácteos / día	2,38	1,2	1,68	0	7
Raciones cereales / día	1,07	1,04	1,04	0	3
Raciones conservas / día	0.44	0.59	0,41	0	3
Raciones pescado / semana	2,52	1,36	2,04	1	10
Raciones carne roja / semana	1,66	1,44	2,33	1	9

Tabla XVI. Tratamientos crónicos recibidos por las pacientes.

	Casos	Porcentaje (%)
Corticoides	74	4,15
Benzodiacepinas	199	11,18
Antiepilépticos	9	0,5

Tabla XVII. Formación de las Cohortes

Grupo	N	Criterio densitométrico
CONTROL	479	DMO > -1 DE
OSTEOPENIA	766	DMO entre -1 Y -2.5 DE
OSTEOPOROSIS	450	DMO < -2.5 DE

2. INFERENCIA ESTADÍSTICA

Tabla XVIII. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

	NORMAL n = 479	OSTEOPENIA n =766	OSTEOPOROSIS n = 450	P=
Edad*	62 ± 8.14	62 ± 8.12	62 ± 8.10	N.S
Peso*	69,68 ± 11,44	65,89 ± 10.41	63.40 ± 9.87	p<0.05
Talla*	158,56 ± 6,37	157.18 ± 6,08	155.74± 5.87	p<0.05
Menarquia*	12.61 ± 1.50	12.74 ± 1.56	12.87 ± 1.7	p<0.05
Edad menopausia*	48.05 ± 5.26	47.40 ±5.59	46.84 ± 5.7	p< 0.05
Menopausia < 45 años	98 (20,45%)	204(26,63%)	134 (29,77%)	p< 0.05
Menop < 40 a	32 (6,68%)	57 (7,44%)	50 (11,11%)	p< 0.05
Paridad*	2.84 ± 1.89	2.65 ± 1.74	2.77 ±1.83	N.S
Distribución grasa				N.S
- Androide	75 (15,65%)	135 (17,62%)	69 (15,33%)	
- Ginecoide	192 (40,08%)	291 (37,98%)	169 (37,55%)	
- Ninguna	202 (42,17%)	331 (43,21%)	197 (43,77%)	

*Media ± desviación estándar

Como se aprecia en la Tabla XVIII, no existen diferencias significativas entre los tres grupos respecto a la edad o procedencia geográfica, sin embargo sí las hay en el peso y talla, de manera que el menor peso y estatura se corresponden con menor DMO

En referencia a la edad de la menarquia y edad de la menopausia, las que marcan el periodo de vida con actividad estrogénica, encontramos diferencias entre los tres grupos, de tal manera que la menarquia está más retrasada y la menopausia más adelantada entre las osteoporóticas.

Las pacientes con menor DMO presentan un intervalo fértil más corto con una edad media de aparición de menarquia más tardía y una edad media de aparición de menopausia más temprana. Este dato es congruente con el

hecho de que en el grupo de pacientes con osteoporosis hay significativamente mas casos de menopausias antes de los 45 años y de los 40 años.

No se han hallado diferencias significativas en el patrón predominante de distribución grasa (androide, ginecoide o ninguna en particular) ya que la distribución de los distintos subtipos es similar en los 3 grupos.

El número de embarazos fue parecido en los distintos grupos no hallándose diferencias significativa tras el análisis de los mismos.

Tabla XIX. Características de la menopausia.

	NORMAL n = 479	OSTEOPENIA n =766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Menopausia natural	361 (75,32%)	586 (76,52%)	346 (76,82%)	N.S
Síntomas pasados				
-No	116 (24,21%)	135 (17,62%)	115 (25,52%)	N.S
-Leve	351 (73,27%)	586 (76,50%)	329 (73,1%)	
- Intensos	4 (0,01%)	5 (0,06%)	5 (0,01%)	
Síntomas actuales				N.S
-No	206 (43,00%)	308 (40,20%)	202 (44,88%)	
-Leve	230(48,01%)	363 (47,38%)	189 (42%)	
-Intensos	33 (6,88%)	189 (24,67%)	57 (12,66%)	

No existen diferencias significativas entre los grupos dependiendo de si la menopausia ocurrió de forma natural o no. La presencia y magnitud de la sintomatología acompañante, tanto la que hubiesen presentado las pacientes, como la presente en el momento del estudio fue similar en los tres grupos.

Tabla XX. Síntomas relacionados con la menopausia pasados en algún momento

	NORMALES n = 479	OSTEOPENIA n = 766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Vasomotores	153 (31,94%)	271 (35,37%)	173 (38,44%)	N.S
Sexuales	134 (27,97%)	253 (33,02%)	122 (27,11%)	N.S
Psíquicos	108 (22,54%)	195 (25,45%)	96 (21,33%)	N.S
Osteoarticulares	324 (67,64%)	509 (66,44%)	280 (62,22%)	N.S

Tabla XXI. Síntomas relacionados con la menopausia presentes en la actualidad

	NORMALES n = 479	OSTEOPENIA n = 766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Vasomotores	151 (31,5%)	236 (30,8%)	112 (24,8%)	N.S
Sexuales	46 (9,6%)	89 (11,6%)	38 (8,4%)	N.S
Psíquicos	58 (12,1%)	106 (13,8%)	35 (7,7%)	N.S
Osteoarticulares	140 (29,2%)	229 (29,8%)	134 (29,7%)	N.S

En las tablas XX y XXI podemos observar que no existen diferencias en el porcentaje de mujeres que hubiesen presentado o presentan en el momento del estudio algún tipo de sintomatología propia del Climaterio, ni siquiera para los síntomas osteoarticulares, cuya presencia es, en este análisis, independiente de la magnitud de la DMO.

Tabla XXII. FACTORES HIGIÉNICO - DIETÉTICOS: Hábitos

	NORMAL n = 479	OSTEOPENIA n =766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Fumadora	143 (29,85%)	241 (31,46%)	157 (34,88%)	p< 0.05
Alcohol	168 (35,07%)	225 (29,37%)	113 (25,11%)	p< 0.05
Nº días en semana que hace deporte *	4.65 ± 2.01	4.61 ± 1.99	4.74 ± 1,97	N.S
Ejercicio físico				
- Regular	262 (54,69%)	433 (56,52%)	254 (56,44%)	N.S
- Sedentario	79 (16,49%)	113 (14,75%)	51 (11,33%)	N.S
- Tareas hogar	131 (27,34%)	51 (6,65%)	142 (31,55%)	N.S

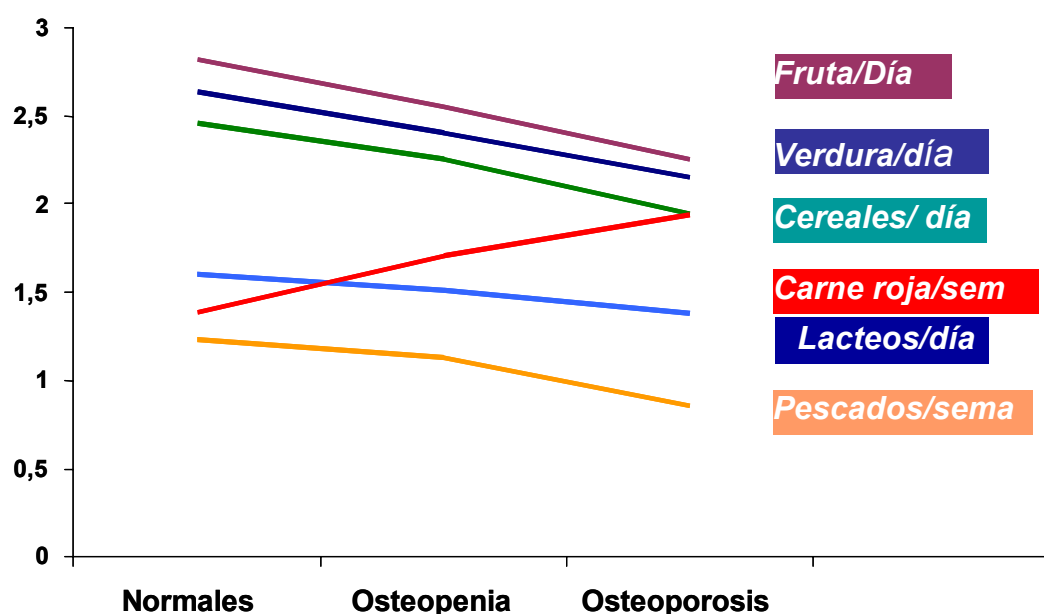
En la tabla XXII se exponen los factores modificables (higiénico-dietéticos) relacionados con el desarrollo de OP en las mujeres de nuestro estudio. Destaca la una relación directa entre el consumo de tabaco y una inversa entre el consumo moderado de alcohol con la DMO. En nuestro estudio, la práctica de ejercicio físico no se correspondía con mayor DMO.

Tabla XXIII. FACTORES HIGIÉNICO – DIETÉTICOS: Dieta

	NORMAL n = 479	OSTEOPENIA n =766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Nº veces toma Fruta /día *	2.46 ± 1.32	2.26 ±1.28	1.95 ±1.11	p< 0.05
Verdura/día *	1.60 ±1.12	1.51 ±1.02	1.38 ± 0.7	p< 0.05
Cereales/día *	1,23 ±1,07	1,12 ±1,11	0,86 ±0,87	p< 0.05
Conservas /día *	0,43 ±0,62	0.43 ±0.62	0.43 ± 0.59	N.S
Lacteos/día *	2.64 ± 1.42	2.41 ± 1.29	2.15 ± 1.08	p< 0.05
Carne roja/seman *	1,39 ±1,21	1.71 ±1.42	1.94 ±1.48	p< 0.05
Pescado/semana *	2.82 ±1.41	2.55 ±1.38	2.26 ±1.18	p< 0.05

*Media ± desviación estándar

Figura 7: Relación entre el consumo de alimentos y la DMO



En la tabla XXIII y la figura 7 se observa una correlación directa entre el consumo de verdura, fruta, lácteos, cereales y pescado con la DMO. Mientras el consumo de carnes rojas se asocia con una menor DMO. En todos los casos, salvo para el consumo de cereales existe significación estadística.

Tabla XXIV. TRATAMIENTOS CRÓNICOS

	NORMAL n = 479	OSTEOPENIA n =766	OSTEOPOROSIS n = 450	P =
Tratamiento crónico con corticoides	10 (2,08%)	41 (5,35%)	23 (5,11%)	p< 0.05
Tratamiento crónico con BZD	58 (12,1%)	91 (11,87%)	50 (11,11%)	N.S
Tratamiento crónico con Antiepilépticos	4 (0,83%)	3 (0,39%)	2 (0,44%)	N.S

Como era de esperar, el uso crónico de corticoides es más frecuente en el grupo de pacientes con osteopenia u osteoporosis. Igualmente, para otras terapias relacionadas indirectamente con la posibilidad de la fractura, por acompañarse de mayor predisposición a la caída (benzodiazepinas o antiepilépticos) no encontramos diferencias entre los tres grupos.

3.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Tabla XXV. Poblaciones de estudio.

POBLACIÓN	TOTAL	NORMALES (%)	OSTEOPENIA (%)	OSTEOPOROSIS (%)	P =
INICIAL	1695	28,25	45,19	26,54	N.S
FSHR	689	22,64	48,76	28,59	N.S
ESR1	679	22,38	49,18	28,42	N.S
ESR2	688	22,67	48,69	28,63	N.S
RIP140	689	22,64	48,76	28,59	N.S
CYP19 UTR3'	1089	28,09	46,09	25,8	N.S
CYP 19 IVS4	1089	28,09	46,09	25,8	N.S
BMP15 CT	1088	28,03	46,12	25,82	N.S
BMP15 CG	1088	28,03	46,12	25,82	N.S
BMP15 AG	1088	28,03	46,12	25,82	N.S
BMP15 S	1088	28,03	46,12	25,82	N.S

Las características de las subpoblaciones seleccionadas para el estudio de los distintos genes no difieren significativamente de la población inicial por lo que su representatividad es adecuada.

Tabla XXVI. GEN DEL RECEPTOR DE LA FSH (FSHR)

	Normal n = 156	Osteopenia n = 336	Osteoporosis n = 197	Total	P =
FSHR AS	78 (50%)	170 (50,59%)	86 (43,65%)	334	N.S
FSHR AA	48 (30,76%)	109 (32,44%)	68 (34,51%)	225	N.S
FSHR SS	30 (19,23%)	57 (16,96%)	43 (21,82%)	130	N.S

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 689 participantes en el estudio. De ellas, 156 (22,64%) padecían osteoporosis, 336 (48,76%) osteopenia y 197 (28,59%) presentaban una DMO por encima de -1 .

El polimorfismo del gen FSHR más frecuente es el AA, la presencia de los polimorfismos AA y SS de éste gen es parecida en los 3 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la aparición de enfermedad.

Tabla XXVII. GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO 1 (ESR1)

	Normal n = 152	Osteopenia n = 334	Osteoporosis n = 193	Total	P =
ESR1 TC	81 (53,28%)	160 (47,90%)	97 (50,25%)	338	N.S
ESR1 CC	32 (21,05%)	87 (26,04%)	35 (18,13%)	154	N.S
ESR1 TT	39 (25,65%)	87 (26,04%)	61 (31,60%)	187	N.S

Los polimorfismos de este gen se estudiaron en 679 pacientes; 152(22,38%) normales, 334 (49,18%) osteopénicas y 193 (28,42%) padecían osteoporosis.

El polimorfismo TC del gen ESR1 es el más frecuente. Los distintos polimorfismos de este gen no se relacionan con la DMO ya que su distribución es similar en los tres grupos.

Tabla XXVIII. GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO 2 (ESR 2)

	Normal n = 156	Osteopenia n = 335	Osteoporosis n = 197	Total	P =
ESR2 GA	72 (46,15%)	152 (45,37%)	99 (50,25%)	323	N.S
ESR2 AA	25 (16,02%)	63 (18,8%)	30 (15,22%)	118	N.S
ESR2 GG	59 (37,82%)	120 (35,82%)	68 (34,51%)	247	N.S

Los polimorfismos del gen ESR2 se determinaron en un total de 688 pacientes, de las cuales, 156 (22,67%) eran sanas, 335 (48,69%) padecían osteopenia y 197 (28,63%) osteoporosis.

El polimorfismo GA es el más frecuente en esta población. No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXIX. GEN RECEPTOR NUCLEAR INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS NRIP1

	Normal n = 156	Osteopenia n = 336	Osteoporosis n = 197	Total	P =
RIP140 GA	87 (55,76%)	170 (50,59%)	99 (50,25%)	356	N.S
RIP140 GG	45 (28,84%)	102 (30,35%)	54 (27,41%)	201	N.S
RIP140 AA	24 (15,38%)	64 (19,04%)	44 (22,33%)	132	N.S

Se han determinado los polimorfismos de éste gen en 689 pacientes; 156 (22,64%) sanas, 336 (48,76%) osteopénicas y 197 (28,59%) osteoporóticas

El polimorfismo más frecuente en nuestra población es el GA. Los distintos polimorfismos de éste gen presentan una distribución similar en los tres grupos no relacionándose ésta con la presencia de enfermedad.

Tabla XXX. GEN CYP19A1, marcador 3'UTR

	Normal n = 306	Osteopenia n = 502	Osteoporosis n = 281	Total	P =
CYP19 GA	160 (52,28%)	256 (50,99%)	125 (44,48%)	541	N.S
CYP19 AA	77 (25,16%)	137 (27,29%)	80 (28,46%)	294	N.S
CYP19 GG	69 (22,54%)	109 (21,71%)	76 (27,04%)	254	N.S

Se han determinado los polimorfismos del gen CYP, marcador 3'UTR en un total de 1089 pacientes, de las cuales 306 (28,09%) eran sanas, 502 (46,09%) eran osteopénicas y 281 (25,8%) padecían osteoporosis.

El polimorfismo más frecuente es el GA. No hay diferencias entre los grupos respecto a la distribución de los distintos polimorfismos, por lo que no parece haber relación entre los polimorfismos de este gen y el grado de osteoporosis.

Tabla. XXXI. GEN CYP19A1, marcador IVS4

	Normal n = 306	Osteopenia n = 502	Osteoporosis n = 281	Total	P =
IVS 12,00	148 (48,36%)	226 (45,01%)	124 (44,12%)	498	N.S
IVS 11,00	125 (40,84%)	214 (42,62%)	110 (39,14%)	449	N.S
IVS 22,00	33 (10,78%)	62 (12,35%)	47 (16,72%)	142	N.S

Este gen se ha determinado en un total de 1089 pacientes; 306 (28,09%) eran sanas, 502 (46,09%) padecían osteopenia y 281 (25,8%) osteoporosis.

El polimorfismo 12,00 es la forma más frecuente de este gen en la población.

Los polimorfismos de este gen no parecen asociarse de manera significativa con la DMO ya que la distribución de los mismos es parecida en los 3 grupos.

Tabla XXXII. Polimorfismos del gen de BMP 15. marcador -9C>G.

	Normal n = 305	Osteopenia n = 502	Osteoporosis n = 281	Total	P =
BMP15CG CC	199 (65,24%)	324 (64,54%)	185 (65,83%)	708	N.S
BMP15CG GC	95 (31,14%)	155 (30,87%)	83 (29,53%)	333	N.S
BMP15CG GG	11 (3,6%)	23 (4,58%)	13 (4,62%)	47	N.S

Se ha determinado en 1088 pacientes, 305 sanas (28,03%), 502 (46,13%) osteopénicas, y 281 (25,82%) osteoporóticas.

La forma más frecuente es el polimorfismo CC. En los tres grupos se aprecia una distribución de los distintos polimorfismos parecida sin relacionarse ésta con el grado de enfermedad.

Tabla XXXIII Polimorfismos del gen de BMP 15. Marcador IVS1+905A>G.

	Normal n = 305	Osteopenia n = 502	Osteoporosis n = 281	Total	P =
BMP15AG TT	170 (55,73%)	260 (51,79%)	156 (55,51%)	587	N.S
BMP15AG TC	114 (37,37%)	209 (41,63%)	100 (35,58%)	423	N.S
BMP15AG CC	21 (6,88%)	33 (6,57%)	25 (8,89%)	79	N.S

Se ha determinado en 1088 pacientes, 305 sanas (28,03%), 502 (46,13%) osteopénicas, y 281 (25,82%) osteoporóticas.

La forma más frecuente de este polimorfismo es la TT. No hay diferencias significativas entre los grupos de enfermedad con respecto a éste polimorfismo no hallándose relación significativa de ninguno de ellos con la DMO.

4.- ESTUDIO DE INTERACCIÓN GÉNICA: ANÁLISIS DIGÉNICO

4.1. Análisis digénico entre genes candidatos de la ruta estrogénica ya relacionados con la OP (ESR1, ESR2, FSHR, CYP19).

Tabla XXXIV. Interacción entre genes ESR1 y ESR 2

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - ESR2 GG	0,38	0,66	2,83
	ESR1 TT - ESR2 GA	0,29	0,75	2,56
	ESR1 TT - ESR2 AA	0,64	0,26	2,27
	ESR1 TC - ESR2 GG	0,27	0,43	1,67
	ESR1 TC - ESR2 GA	0,88	0,63	1,70
	ESR1 TC - ESR2 AA	0,71	0,52	2,57
	ESR1 CC - ESR2 GG	0,70	0,36	1,98
	ESR1 CC - ESR2 GA	0,73	0,42	1,82
	ESR1 CC - ESR2 AA	0,67	0,24	2,47

Tabla XXXV. Interacción entre genes ESR1 FSHR.

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - FSHR SS	0,87	0,52	3,22
	ESR1 TT - FSHR AS	0,34	0,07	5,23
	ESR1 TT - FSHR AA	0,34	0,07	5,23
	ESR1 TC - FSHR SS	0,98	0,52	1,89
	ESR1 TC - FSHR AS	0,91	0,57	1'86
	ESR1 TC - FSHR AA	0,91	0,57	1,86
	ESR1 CC - FSHR SS	0,70	0,31	5,61
	ESR1 CC - FSHR AS	0,29	0,30	1,43
	ESR1 CC - FSHR AA	0,29	0,30	1,43

Tabla XXXVI. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador 3'UTR)

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - CYP AA	0,14	0,81	4,15
	ESR1 TT - CYP GA	0,27	0,36	1,26
	ESR1 TT - CYP GG	0,13	0,84	3,58
	ESR1 TC - CYP AA	0,32	0,73	2,56
	ESR1 TC - CYP GA	0,29	0,47	1,25
	ESR1 TC - CYP GG	0,62	0,44	1,62
	ESR1 CC - CYP AA	0,45	0,47	5,41
	ESR1 CC - CYP GA	0,10	0,29	1,13
	ESR1 CC - CYP GG	0,52	0,47	4,38

Tabla XXXVII. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador IVS4)

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - IVS 11	0,30	0,72	2,79
	ESR1 TT - IVS 12	0,92	0,49	1,91
	ESR1 TT - IVS 22	0,31	0,63	4,12
	ESR1 TC - IVS 11	0,37	0,74	2,16
	ESR1 TC - IVS 12	0,10	0,47	1,08
	ESR1 TC - IVS 22	0,80	0,44	2,57
	ESR1 CC - IVS 11	0,41	0,30	1,64
	ESR1 CC - IVS 12	0,46	0,37	1,55
	ESR1 CC - IVS 22	0,37	0,47	1,35

Tabla XXXVIII. Interacción entre genes ESR2 y FSHR

N= 353		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR2 GG - FSHR SS	0,53	0,34	1,72
	ESR2 GG - FSHR AS	0,85	0,55	2,03
	ESR2 GG - FSHR AA	0,85	0,55	2,03
	ESR2 GA - FSHR SS	0,96	0,89	4,18
	ESR2 GA - FSHR AS	0,35	0,73	2,35
	ESR2 GA - FSHR AA	0,35	0,73	2,35
	ESR2 AA - FSHR SS	0,65	0,26	2,28
	ESR2 AA - FSHR AS	0,80	0,33	2,35
	ESR2 AA - FSHR AA	0,80	0,33	2,35

Tabla XXXIX. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

N=353		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	CYP AA - ESR2 GG	0,24	0,56	9,86
	CYP GA - ESR2 GG	0,74	0,32	4,94
	CYP GG - ESR2 GG	0,29	0,50	9,02
	CYP AA - ESR2 GA	0,16	0,66	11,61
	CYP GA - ESR2 GA	0,52	0,40	5,84
	CYP GG - ESR2 GA	0,15	0,68	11,03
	CYP AA - ESR2 AA	0,10	0,76	19,95
	CYP GA - ESR2 AA	0,65	0,31	6,07
	CYP GG - ESR2 AA	0,31	0,14	1,81

Tabla XL. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador IVS4).

N= 353		P=	I.C. 95,0% para EXP(B)	
			Inferior	Superior
	ESR2 GG - IVS4 11	0,37	0,41	10,37
	ESR2 GG - IVS4 12	0,96	0,21	5,01
	ESR2 GG - IVS4 22	0,21	0,51	19,84
	ESR2 GA - IVS4 11	0,48	0,36	8,51
	ESR2 GA - IVS4 12	0,55	0,34	7,92
	ESR2 GA - IVS4 22	0,27	0,48	13,45
	ESR2 AA - IVS4 11	0,38	0,39	11,59
	ESR2 AA - IVS4 12	0,74	0,24	7,40
	ESR2 AA- IVS4 22	0,49	0.13	2,66

Tabla XLI. Interacción entre genes FSHR y CYP 19 (marcador 3'UTR3).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	CYP AA - FSHR SS	0,52	0,52	3,50
	CYP GA - FSHR SS	0,97	0,49	2,08
	CYP GG - FSHR SS	0,16	0,73	6,45
	CYP AA - FSHR AS	0,01	1,38	8,19
	CYP GA - FSHR AS	0,19	0,34	1,24
	CYP GG - FSHR AS	0,24	0,73	3,43
	CYP AA - FSHR AA	0,01	1,29	7,44
	CYP GA - FSHR AA	0,11	0,32	1,12
	CYP GG - FSHR AA	0,32	0,68	3,11

Tabla XLII. Interacción entre genes FSHR y CYP19 (marcador IVS4).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	FSHR SS - IVS 11	0,24	0,73	3,43
	FSHR SS - IVS 12	0,45	0,33	1,66
	FSHR SS - IVS 22	0,07	0,85	19,47
	FSHR AS - IVS 11	0,08	0,92	3,55
	FSHR AS - IVS 12	0,34	0,38	1,40
	FSHR AS - IVS 22	0,10	0,83	6,13
	FSHR AA - IVS 11	0,12	0,87	3,21
	FSHR AA - IVS 12	0,22	0,36	1,26
	FSHR AA - IVS 22	0,14	0,78	5,58

En las tablas XXXIV a XLII, podemos observar el estudio de interacción digénica entre los polimorfismos de los genes candidatos ya relacionados con la OP: ESR1, ESR2, FSHR y CYP en sus dos variantes estudiadas (IVS4 y UTR3'). Encontramos interacción entre las variantes del CYP19, en concreto la AA del UTR3' con las variantes AA y AS del FSHR (Tabla XLI).

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente al desarrollo de osteoporosis en nuestra población.

4.2. Interacción digénica entre nuevos genes candidatos de la ruta estrogénica (NRIP y BMP15)

Tabla XLIII. Interacción entre genes NRIP1 y ESR1.

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - NRIP AA	0,33	0,54	5,99
	ESR1 TT - NRIP GA	0,53	0,67	2,13
	ESR1 TT - NRIP GG	0,64	0,55	2,57
	ESR1 TC - NRIP AA	0,61	0,59	2,45
	ESR1 TC - NRIP GA	0,28	0,47	1,24
	ESR1 TC -NRIP GG	0,91	0,57	1,96
	ESR1 CC- NRIP AA	0,22	0,67	5,65
	ESR1 CC- NRIP GA	0,44	0,38	1,52
	ESR1 CC- NRIP GG	0,13	0,13	1,28

Tabla XLIV. Interacción entre genes NRIP1 y ESR2.

N= 353		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR2 GG - NRIP AA	0,39	0,62	3,36
	ESR2 GG- NRIP GA	0,46	0,79	1,38
	ESR2 GG- NRIP GG	0,39	0,33	1,53
	ESR2 GA - NRIP AA	0,42	0,64	2,86
	ESR2 GA - NRIP GA	0,52	0,71	1,92
	ESR2 GA- NRIP GG	0,73	0,50	1,61
	ESR2 AA - NRIP AA	0,28	0,54	8,04
	ESR2 AA - NRIP GA	0,93	0,23	1,12
	ESR2 AA- NRIP GG	0,32	0,58	5,09

Tabla XLV. Interacción entre genes NRIP1 y FSHR.

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	FSHR SS - NRIP AA	0,89	0,21	3,75
	FSHR SS - NRIP GA	0,30	0,71	2,96
	FSHR SS - NRIP GG	0,61	0,53	2,85
	FSHR AS - NRIP AA	0,08	0,91	4,89
	FSHR AS - NRIP GA	0,52	0,65	2,27
	FSHR AS - NRIP GG	0,80	0,42	1,93
	FSHR AA - NRIP AA	0,11	0,85	4,44
	FSHR AA - NRIP GA	0,69	0,62	2,05
	FSHR AA - NRIP GG	0,63	0,40	1,75

Tabla XLVI. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	CYP AA - NRIP AA	0,88	0,27	4,54
	CYP GA- NRIP AA	0,85	0,27	2,96
	CYP GG- NRIP AA	0,22	0,10	1,68
	CYP AA - NRIP GA	0,57	0,23	2,25
	CYP GA- NRIP GA	0,04	0,11	0,96
	CYP GG- NRIP GA	0,39	0,21	1,85
	CYP AA- NRIP GG	0,62	0,22	2,48
	CYP GA- NRIP GG	0,04	0,10	0,97
	CYP GG- NRIP GG	0,19	0,71	5,09

Encontramos asociación estadísticamente significativa entre las interacciones digénicas CYP AA-RIP GA y CYPGA-RIPGG y el desarrollo de osteoporosis en nuestra población

Tabla XLVII. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador IVS4).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	IVS 11 - NRIP AA	0,46	0,11	2,64
	IVS 12 - NRIP AA	0,89	0,19	4,10
	IVS 22 - NRIP AA	0,42	0,07	3,03
	IVS 11- NRIP GA	0,44	0,14	2,35
	IVS 12- NRIP GA	0,06	0,06	1,09
	IVS 22- NRIP GA	0,59	0,14	2,94
	IVS 11- NRIP GG	0,32	0,11	2,07
	IVS 12- NRIP GG	0,16	0,08	1,52
	IVS 22- NRIP GG	0,26	0,56	8,27

Tabla XLVIII. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador -9C>G).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15CG GG - NRIP AA	0,36	0,28	29,41
	BMP15CG GC - NRIP AA	0,17	0,71	6,17
	BMP15CG CC - NRIP AA	0,22	0,74	3,44
	BMP15CG GG - NRIP GA	0,96	0,22	4,20
	BMP15CG GC - NRIP GA	0,85	0,46	1,90
	BMP15CG CC - NRIP GA	0,54	0,66	2,16
	BMP15CG GG - NRIP GG	0,59	0,16	22,43
	BMP15CG GC - NRIP GG	0,28	0,66	4,11
	BMP15CG CC - NRIP GG	0,34	0,45	1,31

Tabla XLIX. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador IVS1+905A>G).

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15AG TT - NRIP AA	0,81	0,18	3,83
	BMP15AG TC - NRIP AA	0,93	0,18	4,78
	BMP15AG CC - NRIP AA	0,60	0,15	26,73
	BMP15AG TT - NRIP GA	0,52	0,14	2,64
	BMP15AG TC - NRIP GA	0,33	0,11	2,10
	BMP15AG CC- NRIP GA	0,54	0,10	3,40
	BMP15AG TT - NRIP GG	0,38	0,11	2,26
	BMP15AG TC- NRIP GG	0,64	0,14	3,29
	BMP15AG CC- NRIP GG	0,51	0,39	6,51

Tabla L. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR1.

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - BMP15 CG GG	0,70	0,14	17,6
	ESR1 TT - BMP15 CG GC	0,19	0,76	3,95
	ESR1 TT - BMP15CG CC	0,70	0,65	1,89
	ESR1 TC - BMP15CG GG	0,51	0,39	6,47
	ESR1 TC - BMP15CG GC	0,60	0,48	1,52
	ESR1 TC - BMP15CG CC	0,68	0,58	1,62
	ESR1 CC - BMP15CG GG	0,44	0,35	4,34
	ESR1 CC - BMP15CG GC	0,31	0,19	1,70
	ESR1 CC - BMP15CG CC	0,90	0,54	1,83

Tabla LI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR1.

N= 345		P =	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	ESR1 TT - BMP15AG TT	0,84	0,59	1,88
	ESR1 TT - BMP15AG TC	0,34	0,69	2,80
	ESR1 TT - BMP15AG CC	0,20	0,46	34,74
	ESR1 TC - BMP15AG TT	0,86	0,60	1,52
	ESR1 TC - BMP15AG TC	0,47	0,46	1,43
	ESR1 TC - BMP15AG CC	0,74	0,41	3,42
	ESR1 CC - BMP15AG TT	0,83	0,55	2,09
	ESR1 CC - BMP15AG TC	0,21	0,23	1,39
	ESR1 CC - BMP15AG CC	0,76	0,15	3,94

Tabla LII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR2.

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15CG GG - ESR2 GG	0,50	0,21	23,83
	BMP15CG GC - ESR2 GG	0,40	0,26	1,70
	BMP15CG CC - ESR2 GG	0,85	0,41	2,05
	BMP15CG GG - ESR2 GA	0,78	0,25	6,07
	BMP15CG GC - ESR2 GA	0,46	0,57	3,45
	BMP15CG CC - ESR2 GA	0,79	0,42	1,94
	BMP15CG GG - ESR2 AA	0,44	0,03	4,53
	BMP15CG GC - ESR2 AA	0,77	0,26	2,70
	BMP15CG CC - ESR2 AA	0,86	0,52	2,15

Tabla LIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR2.

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15AG TT - ESR2 GG	0,39	0,24	33,06
	BMP15AG TC - ESR2 GG	0,77	0,12	17,12
	BMP15AG CC - ESR2 GG	0,36	0,23	51,89
	BMP15AG TT - ESR2 GA	0,52	0,15	25,16
	BMP15AG TC - ESR2 GA	0,29	0,31	43,36
	BMP15AG CC - ESR2 GA	0,25	0,35	65,22
	BMP15AG TT - ESR2 AA	0,42	0,22	33,86
	BMP15AG TC - ESR2 AA	0,54	0,17	28,13
	BMP15AG CC - ESR2 AA	0,44	0,35	4,47

Tabla LIV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y FSHR.

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15CG GC - FSHR SS	0,07	0,90	6,49
	BMP15CG CC - FSHR SS	0,64	0,61	2,22
	BMP15CG GG - FSHR AS	0,25	0,39	33,15
	BMP15CG GC - FSHR AS	0,73	0,54	2,34
	BMP15CG CC - FSHR AS	0,37	0,74	2,23
	BMP15CG GG - FSHR AA	0,28	0,36	30,41
	BMP15CG GC - FSHR AA	0,89	0,51	2,11
	BMP15CG CC - FSHR AA	0,52	0,70	2,01

Tabla LV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y FSHR.

N= 353		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15AG TT - FSHR SS	0,58	0,61	2,39
	BMP15AG TC - FSHR SS	0,03	1,09	7,55
	BMP15AG TT - FSHR AS	0,41	0,71	2,28
	BMP15AG TC - FSHR AS	0,88	0,48	1,88
	BMP15AG CC - FSHR AS	0,04	1,01	65,90
	BMP15AG TT - FSHR AA	0,56	0,67	2,05
	BMP15AG TC - FSHR AA	0,70	0,45	1,70
	BMP15AG CC - FSHR AA	0,06	0,94	60,41

Tabla LVI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

N= 587		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15CG GG - CYP AA	0,48	0,08	3,28
	BMP15CG GC - CYP AA	0,83	0,45	1,87
	BMP15CG CC - CYP AA	0,43	0,45	1,40
	BMP15CG GG - CYP GA	0,88	0,28	2,93
	BMP15CG GC - CYP GA	0,11	0,33	1,12
	BMP15CG CC - CYP GA	0,04	0,36	0,98
	BMP15CG GG - CYP GG	0,61	0,27	9,00
	BMP15CG GC - CYP GG	0,16	0,30	1,23
	BMP15CG CC - CYP GG	0,09	0,93	2,30

La interacción digénica BMP15 marcador -9C>G CG y CYP 19 marcador 3'UTR GA se asocia de manera significativa a la existencia de enfermedad.

Tabla LVII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

N= 587		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15AG TT - CYP AA	0,30	0,13	1,86
	BMP15AG TC - CYP AA	0,74	0,21	3,02
	BMP15AG CC - CYP AA	0,29	0,07	2,19
	BMP15AG TT - CYP GA	0,19	0,12	1,53
	BMP15AG TC - CYP GA	0,18	0,11	1,52
	BMP15AG CC - CYP GA	0,69	0,16	3,26
	BMP15AG TT - CYP GG	0,68	0,20	2,80
	BMP15AG TC - CYP GG	0,20	0,10	1,59
	BMP15AG CC - CYP GG	0,29	0,55	6,66

Tabla LVIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

N= 587		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15CG GG - IVS11	0,80	0,23	3,03
	BMP15CG GC - IVS11	0,25	0,32	1,34
	BMP15CG CC - IVS11	0,02	0,24	0,89
	BMP15CG GG - IVS12	0,47	0,15	2,35
	BMP15CG GC - IVS12	0,01	0,19	0,81
	BMP15CG CC - IVS12	0,06	0,29	1,03
	BMP15CG GG - IVS22	0,72	0,03	10,23
	BMP15CG GC - IVS22	0,39	0,25	1,71
	BMP15CG CC - IVS22	0,03	1,06	3,39

Las interacciones entre CYP 19 marcador IVS4 11 - BMP 15 marcador -9C>G. CC , CYP 19 marcador IVS 4 12-BMP15 marcador -9C>G GC y CYP 19 marcador IVS4 22- BMP 15 marcador -9C>G se asocian con enfermedad en nuestras pacientes

Tabla LIX. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

N= 587		P=	I.C. 95,0%	
			Inferior	Superior
	BMP15AG TT - IVS11	0,25	0,06	2,04
	BMP15AG TC - IVS11	0,49	0,09	3,13
	BMP15AG CC - IVS11	0,53	0,08	3,68
	BMP15AG TT - IVS12	0,38	0,08	2,60
	BMP15AG TC - IVS12	0,22	0,05	1,93
	BMP15AG CC - IVS12	0,54	0,08	3,79
	BMP15AG TT - IVS22	0,79	0,13	4,73
	BMP15AG TC - IVS22	0,52	0,08	3,51
	BMP15AG CC - IVS22	0,36	0,39	12,07

En las Tablas XLIII a LIX se analizan las interacciones entre los nuevos genes candidatos a OP: NRIP1 y BMP15 (con sus dos marcadores), tanto entre ellos como con los genes ESR1, ESR2, FSHR, CYP19.

Observamos una relación estadísticamente significativa entre OP y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen NRIP1 (tanto la variante GA como la GG) con el gen CYP19 UTR3' (variante GA) ($p < 0.04$)
- gen BMP15 marcador -9C>G (tanto la variante CC como GC) con el gen CYP19 IVS4 (11 y 22) ($p < 0.02$).
- gen BMP15 IVS1+905A>G (tanto la variante CC como la TC) con el gen FSHR (variantes AS y SS) ($p < 0.04$).

DISCUSIÓN

1.- Consideraciones generales.

El conocimiento de los factores de riesgo asociados al desarrollo de la OP resulta vital en la estrategia de prevención de esta enfermedad y de las consecuencias físicas y económicas derivadas de ella. Sin embargo, los medios diagnósticos y los factores identificados en su Epidemiología no han conseguido identificar a todas las pacientes en peligro de presentar una fractura por fragilidad.

Este es el argumento que se esgrime en numerosos estudios que intentan distinguir señales para alertarnos de forma precisa sobre el riesgo de una mujer postmenopáusica de padecer una fractura osteoporótica. Por ejemplo, el estudio OFELY⁸⁶ nos significó tres parámetros principales en este intento: la DMO, los marcadores bioquímicos de remodelado óseo y el antecedente personal de haber padecido una fractura, de tal manera que, en una población de mujeres con osteopenia, la mera presencia de uno de ellos, elevaba el riesgo de presentar una fractura en los siguientes diez años un 26 por ciento. Si ninguno de esos factores estaba presente el porcentaje se reduce al 6 %. Del total de fracturas el 8 % aparecieron en mujeres sanas, 48% en pacientes osteopénicas y el 44 % en osteoporóticas. Igualmente, en un subanálisis procedente del estudio NORA⁸⁷, con más de 91000 participantes, se perfiló un algoritmo que al combinar otros tres valores (antecedente personal de fractura, T-score periférico menor de -1 DE y la sensación subjetiva de mal estado global de salud) se predecía la aparición de una fractura en los siguientes tres años. Sin embargo, este algoritmo sólo adivinó el 65 por ciento de las pacientes que posteriormente presentaron una fractura. En consecuencia, son dos ejemplos de cómo con los medios actuales, existe un número no despreciable de mujeres que escapan a los criterios diagnósticos de OP y se les aleja de la prevención o tratamiento para evitar la fractura.

Al aferramos a la tesis que contempla la patogenia de la OP como un proceso multifactorial con señalada participación de los factores ambientales, probablemente no encontraremos demasiado sentido clínico a la cuestión de si se trata de una enfermedad genética o no; o si existen variantes genéticas que identifiquen pacientes con riesgo de padecer OP o de responder adecuadamente a las opciones terapéuticas.

En efecto, la primera lección que se asimila al relacionarnos con la OP es a no perder la referencia del *ambiotoma* como componente elemental o dispositivo básico en el principio de la fragilidad ósea. Más para comprender la singularidad de este proceso, en tanto distintivo y distinto para cada paciente, es igualmente valiosa la exploración de su *genoma*.

De momento, la principal aportación de la Genética a la práctica clínica es la de averiguar el papel de la variación y la mutación de los genes en la etiología de las enfermedades. Pero en los últimos años su dominio se ha extendido al terreno de la Semiología y al de la respuesta a los tratamientos, otorgando un evidente sentido al principio que reza que no existen dos pacientes iguales, y ha dejado la puerta abierta a la nueva dimensión de la Medicina Predictiva y Personalizada.

El presente estudio multicéntrico desarrollado en cinco centros españoles pretende ahondar precisamente en el conocimiento de las variantes de los genes relacionados con el metabolismo óseo para intentar asimilarlas a la lista de factores de riesgo asociados con la OP.

Además, la descripción detallada del grupo de mujeres que participaron en el estudio nos permite conocer la distribución en nuestro medio de esos factores de riesgo de OP conocidos (peso, edad de la menopausia, enfermedad concomitante, etc) y describir la existencia de otros parámetros desencadenantes o protectores pobremente estudiados hasta la fecha.

Una de las limitaciones de este trabajo es su diseño transversal, que no nos permite establecer una fuerte relación de causalidad entre los valores encontrados con la mitad de la DMO. Esa es una cuestión que debería ser confirmada mediante estudios longitudinales.

Existen otras dificultades inherentes al carácter multicéntrico del trabajo, como la variabilidad de la población seleccionada, y por tanto de sus costumbres higiénico-dietéticas, de los distintos instrumentos de medida de la DMO, y de las diferencias que resultan con las determinaciones analíticas. Hemos intentado minimizarlas mediante la elaboración de un cuestionario detallado, fácil de rellenar y común a los cinco centros (ver anexo 1). Los criterios densitométricos de diagnóstico de osteopenia y osteoporosis son los mismos independientemente del modelo de densitómetro, siempre que éste sea central y no periférico. Al evitar hacer las comparaciones con la variable

cuantitativa “cantidad de hueso por superficie”, medida en g/cm^2 , y limitarnos a dividir la población en tres grupos en función de los criterios establecidos para el diagnóstico de osteopenia u osteoporosis, evitamos la posibilidad de sesgo. Por último, el análisis genético se centralizó en un único laboratorio situado en Sevilla, a donde se enviaron las muestras congeladas antes de su procesamiento.

Por el contrario, el alto número de participantes, otorga a este estudio un alto poder a la hora de extraer conclusiones. Acaso más interesante aún sea su procedencia de consultas de ginecología. En nuestro país disponemos de pocos estudios que analicen las características de las pacientes atendidas por ginecólogos cuando el principal motivo de consulta fue el estudio de su estado óseo. Sabemos que la osteoporosis es un proceso muy prevalente en la mujer postmenopáusica, gracias, casi en exclusiva, a los registros hospitalarios de fracturas por fragilidad o al análisis de la densidad mineral ósea que realizan otros especialistas. La aportación ginecológica es escasa, a pesar de que se trata de una enfermedad en cuyo diagnóstico y tratamiento estamos muy involucrados.

2.- Características epidemiológicas asociadas al desarrollo de OP

2.1. Comentarios sobre los factores de riesgo conocidos de OP

Nuestros datos parecen confirmar que la osteoporosis es una enfermedad estrógeno dependiente ya que cuanto más corto es el periodo fértil más probable es el desarrollo de enfermedad. Lo observamos en la relación entre la edad de la menarquia o de menopausia y el periodo de vida reproductivo con la DMO . También se confirma cuando comparamos el porcentaje de mujeres con menopausia precoz que existen en los tres grupos, siendo más frecuente entre aquellas mujeres con menos DMO (ver tabla XVIII).

Algunos trabajos han propuesto que la presencia e intensidad de síntoma propios del Climaterio (trastornos vasomotores, alteraciones psíquicas o sexuales) con los niveles residuales de estrógenos tras el cese definitivo de las menstruaciones^{88, 89}. Aun cuando no se hicieron determinaciones hormonales en las pacientes de nuestro estudio, nuestros datos no encuentran ninguna relación entre la DMO esta sintomatología, tanto la pasada como la presente en el momento de la encuesta (ver tablas XIX a XXI).

Aparte de la influencia estrogénica, en la patogénesis de la osteoporosis intervienen otros factores no modificables como la edad, el sexo, la raza, o los antecedentes familiares de fracturas por fragilidad. La importancia de ellos radica en que nos marcan a aquellas mujeres en quienes debe realizarse una mayor vigilancia del deterioro óseo. Por el contrario, existen otros determinantes de la masa ósea dependientes de los hábitos de vida, como el bajo peso, el consumo de tabaco o la ingesta abundante de alcohol, así como el sedentarismo, la escasa exposición al sol o el consumo de una dieta pobre el calcio. La importancia de ellos radica en la posibilidad de corrección. Como se ha recomendado en una guía clínica recientemente publicada por la AEEM⁹⁰, cambiar algunos aspectos de la dieta puede ser el mejor medio para mejorar la calidad de vida de la mujer, incluyendo la calidad de sus huesos.

Es de destacar que este estudio describe a una población de mujeres que acudieron al ginecólogo para recibir asesoramiento sobre salud ósea. En ellas

observamos una distribución de los factores de riesgo de osteoporosis similar a la descrita en otros estudios epidemiológicos, tanto la de los no modificables (edad, talla, edad de la menarquia y edad de la menopausia, periodo fértil) como de los modificables (peso, IMC, consumo de lácteos o tabaquismo). Igualmente, la gravedad de la pérdida de la DMO se corresponde a la mayor intensidad del factor de riesgo detectado: a menor peso, menor talla, mayor edad de la menarquia, menor edad de la menopausia, menor consumo de lácteos y mayor consumo de tabaco, se observa una menor DMO y una mayor frecuencia de osteoporosis.

Clásicamente se ha identificado la delgadez como factor de riesgo de osteoporosis. La pérdida de peso está asociada con la pérdida de hueso, y la ganancia de peso con la ganancia de hueso. Los mecanismos moleculares que enlazan la pérdida de peso con la de hueso no están muy claros. Se han planteado varios mecanismos para explicar esta relación: por una parte, al disminuir el tejido adiposo existe menor producción hormonal periférica. El bajo peso se acompaña a menudo de alteraciones menstruales y de escasa síntesis estrogénica en el propio ovario. A esto se suma el efecto mecánico que sobre los huesos ejerce el peso. Además, se han propuesto factores hormonales como el IGF-1 (cuya secreción pancreática depende de los niveles de grasas en el organismo), la hormona del crecimiento⁹¹ o la leptina, segregada por los adipositos, no sólo participa en la composición corporal sino también en la formación de hueso ejerciendo efectos anabólicos por su acción sobre los osteoblastos y su estímulo del eje hormona de crecimiento IGF-1^{92, 93}

Por otra parte, la distribución de la grasa, ya sea de tipo androide o ginecoide, aunque pueda condicionar la salud metabólica o cardiovascular, no ha mostrado tener relación con el riesgo de OP. Como era de esperar, en nuestro estudio tampoco hemos encontrado diferencias entre los grupos estudiados con respecto a este parámetro.

Estas diferencias no las encontramos en otros factores de riesgo analizados y relacionados en la literatura con la osteoporosis, como el antecedente materno de fractura, el padecimiento de enfermedades crónicas o la práctica de ejercicio físico, quizá debido a que, en las encuestas realizadas

se desconocen los antecedentes familiares, y a que se sobredimensiona la práctica de ejercicio físico.

Especialmente llamativo es el análisis de esta última relación. La práctica de ejercicio físico de forma regular se considera, con un alto nivel de evidencia, un factor protector para el desarrollo de fractura de fémur^{94, 95}. En nuestro trabajo, sin embargo, no hemos encontrado tal asociación, quizá porque más de la mitad de las encuestadas refiere realizar algún tipo de ejercicio físico regular (una media de cinco días a la semana) distinto a de las labores propias de la casa. No disponemos de datos suficientes sobre los hábitos de nuestras mujeres postmenopáusicas y si este porcentaje aquí observado se aleja o no de la realidad española, lo que nos hace pensar que, tal vez, sobreestimen lo que es “hacer ejercicio”. Esto parece confirmarse al considerar que según la encuesta nacional de salud publicada en 2003 el 65% de las pacientes mayores de 45 años y el 70% de las mayores de 65 se declaran sedentarias en su tiempo libre⁹⁶.

Con respecto a la relación entre los hábitos tóxicos y el desarrollo de osteoporosis, en nuestra población se identifica el consumo de tabaco con una menor DMO y coincide con la bibliografía que lo identifica como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad^{97, 98}.

Como ocurre respecto a la enfermedad cardiovascular, parece que el consumo moderado de alcohol (una bebida diaria, o como nosotros hemos estimado, de tres a siete bebidas a la semana), parece proteger también frente a la OP⁹⁹. Se especula que esto podría deberse a una acción dual del etanol a dosis bajas que por un lado estimula directamente la acción de los osteoblastos y por otro estimula la síntesis de andrógenos suprarrenales que periféricamente se convertirían a estrona.^{100 101}

El consumo habitual de determinados fármacos se ha asociado al desarrollo de osteoporosis. Entre ellos, el tratamiento crónico con corticoides tiene como efecto secundario conocido una caída en la DMO. Este mecanismo parece estar mediado por alteraciones en el sistema osteoprotegerina- RANK ligando, con aumento de la resorción osea.¹⁰². En esta línea, según nuestros

datos y como era de esperar, en el grupo de osteoporosis se daban más casos de pacientes que habían seguido un tratamiento crónico con corticoides. Por el contrario, no observamos esta asociación con el consumo de otros fármacos directa o indirectamente implicados con las fracturas (sedantes, antiepilépticos)^{103, 104}, probablemente a que estén provocadas más por su efecto sobre las caídas que por su acción sobre la DMO.

2.2. Importancia de la dieta mediterránea.

Precisando una idea apuntada, decíamos que la guía de OP de la AEEM recomendaba cambiar algunos aspectos de la dieta para mejorar la calidad ósea de la mujer postmenopáusica. En este sentido, la dieta mediterránea, se revela como un instrumento muy útil en la prevención de las fracturas osteoporóticas, aparte de su reconocido valor para la salud cardiovascular.

Se conoce como dieta mediterránea al estilo de vida basado en una idealización de algunos patrones de alimentación de los países mediterráneos, especialmente los del lado oriental. Las características principales son un alto consumo de vegetales (frutas, verduras, legumbres, frutos secos, pan y otros cereales), el aceite de oliva como grasa principal, un mayor consumo de aves y pescado que de carnes rojas, y el consumo regular de vino en cantidades moderadas. Los beneficios principales de esta dieta son el mayor consumo de pescado, en especial pescado azul, rico en ácidos grasos omega 3; en el alto consumo de aceite de oliva con un bajo contenido en grasas saturadas (entre 7 y 8% de las calorías) con un consumo de grasa total entre el 25% hasta poco más del 35%.) en lugar de grasas animales, y finalmente en el consumo de vino, que tiene efectos beneficiosos, especialmente el vino tinto por sus antocianos. El aporte importante de compuestos antioxidantes está garantizado por alta ingesta de fruta fresca diaria propia de este estilo de alimentación¹⁰⁶.

La historia de los beneficios en la salud asociados a este tipo de dieta se inició en 1938 cuando se estudió la alimentación de los habitantes de la isla de Creta y tiene su último episodio en junio de 2007 cuando el Gobierno español propone la candidatura de la dieta mediterránea para su inclusión en la lista del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad de la UNESCO.¹⁰⁵

Asociado al consumo de dieta mediterránea se ha descrito un menor riesgo cardiovascular con disminución de colesterol total¹⁰⁶, menor incidencia de accidente cerebro vascular al determinar una menor disfunción endotelial¹⁰⁷ y un beneficio neto en el desarrollo de otras enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus¹⁰⁸ o el síndrome metabólico¹⁰⁹.

Otros trabajos también han observado una posibilidad de mejora de la resistencia ósea. Se desconocen las posibles conexiones fisiopatológicas de esta relación, aunque se adivinan dos posibilidades: algunos de los ingredientes mencionados son ricos en vitamina D¹¹⁰, y contienen una importante concentración de ácidos grasos insaturados (ácidos omega 3, 6 ó 9)¹¹¹, junto a algunos antioxidantes¹¹², sustancias que podrían proporcionar un efecto beneficioso sobre la masa ósea añadido a su acción cardiovascular favorable. Se sabe además que la DMO disminuye con la ingesta de grasas saturadas contenidas en productos cárnicos.

En nuestro trabajo hallamos una relación dosis dependiente entre el consumo de estos preparados y la DMO (ver figura 7) Tras el estudio EVOS¹¹³ que alertó de la importancia de la dieta en la prevención de la osteoporosis, centrándose en la ingesta de productos lácteos, se han ido publicando otros donde se destaca la ingesta de otras sustancias ricas en vitaminas y minerales, con efecto antioxidante y alcalinizante¹¹⁴ que consiguen un mayor pico de masa ósea durante la adolescencia y frenan la pérdida que acontece tras la menopausia.^{115 116}

Aun con las limitaciones de un estudio observacional, este es uno de los pocos trabajos donde se relaciona la salud ósea con la “dieta mediterránea”. En él hemos encontrado una relación directa entre factores alimenticios como el consumo abundante de fruta, verdura y cereales, junto con la ingesta moderada de productos lácteos, pescado y alcohol, más la escasa ingesta de carnes rojas, con la DMO, en el contexto quizá de la disposición al estilo “mediterráneo” de mantener una vida sana.

En conclusión, las características epidemiológicas de nuestra población de mujeres postmenopáusicas muestra un patrón similar al descrito en otros estudios, observándose una relación proporcional entre la magnitud del factor de riesgo y la gravedad de la osteopenia/osteoporosis. Además, hemos observado la existencia de otros factores alimenticios protectores como el consumo de fruta, verdura, cereales, más el consumo moderado de pescado, alcohol y lácteos, con la baja ingesta de carnes rojas. Igual que con los primeros, existe una relación proporcional entre la magnitud de estos factores

alimenticios y la DMO, de tal manera que puede decirse que a mayor seguimiento de la “dieta mediterránea”, menor riesgo de osteoporosis.

3. Análisis de los polimorfismos genéticos de la ruta estrogénica.

3.1. Consideraciones generales

3.1.1. Sobre la OP como enfermedad genética

Podemos convenir que cualquier enfermedad es el resultado de la interacción entre *genoma* y *ambiotoma*, entre marcadores adquiridos y factores ambientales, si bien para la OP en particular aún nos hallamos en el camino que nos aclare o cuantifique la trascendencia del primer componente.

3.1.2. Sobre el papel de los estrógenos en la fisiopatología de la OP

Que el estradiol juegue un papel importante para la adquisición y mantenimiento de la masa ósea en hombres y en mujeres, es una tesis íntegramente aceptada; así como su extensión a múltiples dianas, y por consiguiente su implicación fisiopatológica en otras enfermedades. Esta singularidad de los estrógenos ha sido analizada en un reciente estudio en el que se han aislado más de 3600 sitios de unión de los receptores de estrógenos, o lo que es lo mismo, que aparecen dianas de receptores de estrógenos cada 839 Kilo-bases del genoma⁵⁶.

3.2. Estudio unilocus de poliorfismos de genes candidatos dentro de la ruta estrogénica

De entrada nos hemos inclinado por varios de los *genes candidatos* más estudiados en la literatura (ESR1, ESR2, CYP19A, FSHR) y hemos incluido otros dos hasta ahora no estudiados (el del NRIP1 y el del BMP15), fundamentalmente el segundo, del que se han aislado polimorfismos tampoco descritos⁵¹.

3.2.1. Polimorfismos de los genes de ESR1, ESR2 , FSHR y CYP19A.

El ESR1 y algunos de sus polimorfismos se han relacionado con la DMO, el remodelado óseo y las fracturas por fragilidad en distintas poblaciones con resultados algo contradictorios.^{117 118 119} Nuestros datos muestran el polimorfismo TC como el más frecuente, aunque no encontramos relación significativa entre las distintas alelos y el desarrollo de la enfermedad. (ver tabla XXVII)

Los resultados obtenidos por Geng¹²⁰ y colaboradores en una población asiática respecto a la asociación de osteoporosis postmenopáuisca y los polimorfismos del ESR2 no han sido confirmados en nuestra población. (ver tabla XXVIII)

En un importante estudio realizado en Estados Unidos con 1301 mujeres de distintos grupos étnicos¹²¹ se apreció como las relaciones de los distintos polimorfismos del ESR1 y 2 con la DMO variaban en función del grupo étnico considerado. En esta población, que en teoría tenía factores ambientales comunes, era la dotación genética de cada etnia la que determinaba la existencia o no de asociación. Esto podría explicar por que en nuestra población que genéticamente es bastante uniforme no hayamos encontrado asociación entre los polimorfismos de estos o de los otros genes estudiados pese a que en otras poblaciones si se han encontrado. Además, cada gen candidato tiene descritos varios marcadores o “zonas importantes” cuyos polimorfismos podrían determinar alteraciones en la DMO y que han sido estudiados. Entre los distintos trabajos publicados, no siempre se estudiaba los mismos marcadores aunque el gen al que pertenecen fuera el mismo lo cual podría explicar la disparidad entre los resultados.

Sun y colaboradores¹²² en un novedoso artículo, han descrito el efecto sobre la DMO de la FSH en ratones que parece ser independiente de la acción estrogénica. Ratones sin receptores de FSH no padecían pérdida ósea aunque los niveles de FSH fueran altos. Esta hormona parece actuar directamente sobre los osteoclastos aumentando la resorción ósea. En nuestra población no hemos podido corroborar estos hallazgos ya que no hemos encontrado asociación estadística entre la DMO de nuestras pacientes y los polimorfismos del receptor de la FSH. (ver tabla XXVI)

A pesar de que se ha descrito una relación entre los polimorfismos del gen de la aromatasa y la OP en distintas series¹²³, el análisis individual en nuestros datos, tanto con el IVS4 como con el 3'UTR han sido negativos. (ver tabla XXX y XXXI)

3.2.1. Polimorfismos del gen de NRIP1

NRIP1 es una proteína que modula la actividad transcripcional de los receptores de estrógenos. Sus alteraciones se han relacionado con otras enfermedades dependientes de los estrógenos, pero su papel en el desarrollo de la OP es en la actualidad desconocido.^{124, 125}. En el estudio uniclocus tampoco hemos comprobado una relación entre los polimorfismos de este gen y la osteopenia u OP. (ver tabla XXIX)

3.2.2. Polimorfismos del gen de la Proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15, bone morphogenetic proeyin 15)

La primera mutación del gen de BMP15 fue descrita en ovejas, una de las pocas especies que, como el ser humano, presenta ovulaciones únicas. En las heterocigotas se observaron poliovulaciones y embarazos múltiples, mientras en las homocigotas se producía un bloqueo temprano de la foliculogénesis y eran, por tanto, infértiles. En la actualidad se han identificado otras mutaciones de este gen que producen infertilidad en ovejas y ratonas, pero lo más interesante de estos trabajos consiste en haber estimulado la investigación de los polimorfismos de este y otros genes de la foliculogénesis humana, y se han asociado a procesos ginecológicos como la hiperestimulación ovárica, el fallo ovárico precoz y el síndrome de ovarios poliquísticos¹²⁶.

Aun cuando no se han estudiado los vínculos de los polimorfismos del gen de BMP15 con la masa ósea, sí es importante su asociación con la reducción del periodo de vida fértil y, en consecuencia, con el tiempo de exposición a los estrógenos. En 2004 Di Pascuale describe en dos hermanas afectas de fallo ovárico prematuro la presencia de un polimorfismo del gen BMP15 (Y235C). Más adelante, estos mismos autores confirmaron sus hallazgos en una cohorte de 166 pacientes con menopausia precoz en las que hallaron 7 casos de mutaciones en el gen BMP15 y ninguna en el grupo control ($p= 0.03$). De las 7 mutaciones encontradas 1 era la ya conocida (Y235C) y las seis restantes no estaban hasta entonces descritas. Todos estos polimorfismos

determinaban una alteración en la región pro-proteína provocando también una alteración en la configuración espacial de BMP15, y en consecuencia una alteración en su función¹²⁷.

A pesar de que estos hallazgos se han verificado por otros autores, la evidencia acerca del papel de los polimorfismos del BMP 15 como causa de menopausia precoz empieza a debilitarse con la publicación de estos polimorfismos en otras poblaciones¹²⁸.

Sobre la variante más estudiada del BMP15, la A180T, podemos decir que no es ni suficiente ni necesaria para generar una menopausia prematura, al menos en población española pues, al contrario de lo que sucedió en las otras tres poblaciones, se aísla en mujeres sin menopausia precoz. Sin embargo, si encontramos que cuando aparece el marcador IVS1+905A>G, la menopausia se adelanta un promedio de 1.29 y el periodo fértil se acorta 1.9 años¹²⁹. Acaso las pacientes de otros trabajos anteriores al nuestro constituyan un conjunto heterogéneo, y queda claro a qué grupo étnico pertenecen las que se incluyeron como controles, por lo que las diferentes variantes descritas en ellas, podrían simplemente ser artefactos derivados de la estratificación de la población. En otras palabras, que serían variantes comunes en ciertos grupos étnicos más que variantes causantes de la menopausia precoz.

En consecuencia, no disponemos de suficientes evidencias para relacionar una sola variante funcional de BMP15 con la OP, pero los resultados obtenidos en nuestras mujeres, con adelanto de la edad de la menopausia y disminución de la ventana reproductiva, puede abrirnos posibilidades diagnósticas y terapéuticas en sus afectadas, y bajo esta hipótesis, en el presente trabajo hemos analizado su importancia en 4 marcadores diferentes: BMP 15 CT, BMP 15 CG, BMP 15 AG y BMP 15 S, sin haber hallado relación significativa entre estos polimorfismos y el desarrollo de la OP. (ver tabla XXXII y XXXIII)

3.2.3. Conclusión sobre los estudios unilocus

Nuestro trabajo ha evaluado la relación de los polimorfismos de cada uno de los genes hasta ahora mencionados con la osteopenia o la OP, y muestra una gran heterogenicidad en sus alelos, de tal manera que todas las posibles dotaciones alélicas han sido identificadas en los tres grupos poblacionales establecidos, lo que significa que ninguna de ellas condiciona por sí misma la aparición de esta enfermedad. En otras palabras, ningún polimorfismo aislado de los genes candidatos incluidos en esta población es suficiente ni necesario para el desarrollo de la OP. Este hecho nos lleva a pensar que probablemente su aparición no se deba a la alteración de un único gen, y que la compleja fisiopatología de esta enfermedad podría venir determinada por la acción global de distintos genes que interaccionan entre sí (entre los cuales si podrían tener lugar los genes candidatos hasta ahora identificados) o con los factores ambientales. Esta hipótesis podría explicar también la dificultad para identificar todos los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la OP y la variabilidad existente entre poblaciones y etnias diferentes.

3.3. Estudios de interacción génica.

3.3.1. Justificación y precedentes en OP

De una manera individual, las diferentes variantes genéticas de los *loci* que hemos analizado, han sido estudiadas en gran cantidad de enfermedades relacionadas con los estrógenos, incluida la OP. No obstante, los resultados son muy variados y controvertidos, debido acaso a la falta de poder estadístico en el análisis genético, al empleo de diferentes valoraciones clínicas o a la presencia de estratificación genética. Pensamos que además de ellas, otra poderosa razón asienta en que los estudios univariantes ignoran por completo la naturaleza compleja de esta enfermedad y la posibilidad de interacción de entre las variaciones genéticas con los factores ambientales y de aquellas entre sí.

A la interacción entre dos genes en la configuración de un fenotipo determinado la conocemos como interacción digénica, y depende de la relación existente entre la dotación alélica de cada uno de los genes. En este trabajo, la interacción digénica entre los polimorfismos de los genes candidatos estudiados puede determinarnos a priori distintos fenotipos dentro del metabolismo estrogénico, y condicionar en consecuencia los mecanismos de adquisición y remodelado óseo de una mujer.

Un ejemplo de interacción entre factores ambientales y genéticos se observó en un trabajo previo dentro de esta misma población donde se profundizó en la relación observada por otro grupo español entre la OP y los polimorfismos del gen CYP19A⁷⁹. Como en el actual estudio, también se analizaron los dos marcadores de este gen (el de la región no traducida 3'UTR y el de la región intrónica IVS4). Aparte de confirmar los resultados observados en la población cántabra, se comprobó que el efecto de los alelos de CYP19A1 con respecto a la DMO y a la OP en población española, podría depender del índice de masa corporal de las mujeres posmenopáusicas⁸⁰.

Tanto en relación con la OP como con otras enfermedades relacionadas con los estrógenos, empiezan a aparecer publicaciones que describen varias interacciones génicas, no solo entre genes de la ruta estrogénica, sino también

entre otros genes candidatos en la OP, como el del receptor de la vitamina D (VDR) o el del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)^{130, 131, 132, 133}.

Siguiendo esta dirección, nuestro grupo ya se planteó esta posibilidad entre los genes candidatos del actual trabajo en otros procesos ginecológicos. En uno de ellos se observó una interacción entre ESR1 y ESR2 con situaciones como la edad de la menopausia o de la menarquia¹³⁴ confirmando los datos de una población griega¹³⁵. En otro, que puede considerarse como un análisis preliminar que justifica la presente tesis, se detectó una fuerte asociación entre la OP y dos patrones digénicos en nuestras pacientes: ESR1-ESR2 y ESR2-NRIP1⁷⁶. Este trabajo fue pionero en la inclusión de algunos polimorfismos genéticos en el estudio de la OP y en la perspectiva de la interacción génica como posibilidad que debe relegar al análisis unilocus en la predicción de enfermedades comunes. Descubrir estas interacciones nos ofrece unas grandes perspectivas de encontrar asociaciones entre genes, tanto los que se habían estudiado como con otros de la ruta estrogénica. El abanico de posibilidades se amplía si consideramos otras enfermedades relacionadas con los estrógenos u otros genes candidatos a la OP.

3.3.2. Comentarios sobre nuestros resultados

La dificultad en los estudios de interacción génica en la predicción de enfermedades comunes radica básicamente en la necesidad de una gran población de estudio que permita las comparaciones entre las variantes genéticas. De ahí la escasez actual de publicaciones de esta índole en OP. Además, esta investigación evoluciona hacia formas más complicadas de interacción multigénica, necesitando multiplicar también las poblaciones de estudio. Muy recientemente se está planteado incluso cuál es el método estadístico que mejor pueda cuantificar las implicaciones de estas interacciones¹³⁶.

El punto fuerte de nuestro trabajo es, sin duda, el tamaño de la muestra, que es lo que nos permite este tipo de análisis. El reclutamiento de mujeres voluntarias se realizó con la colaboración de otros centros del país para un proyecto que contempla este y otros objetivos. Comoquiera que la interacción génica se plantea como la principal línea de investigación futura, en la tesis que aquí se defiende se quiere empezar a descubrir la interacción digénica con los genes de la ruta estrogénica seleccionados.

Para simplificar el examen estadístico hemos excluido además al grupo de pacientes osteopénicas, considerando únicamente las sanas y las que presentaban OP. En él se ha empleado un test de regresiones logísticas binarias, valorando que las dotaciones de los dos genes investigados en cada interacción actúan como covariables. En el estudio de esta relación se consideró la influencia de otras variables asociadas a OP (hábito tabáquico, dieta) que pudieran condicionar los resultados, mediante su inclusión en el test estadístico.

En la tabla I podemos observar que las frecuencias genotípicas de todos los marcadores genéticos analizados mantienen el EHW. La determinación del cumplimiento de este principio se usa comúnmente como control de calidad de la genotipación en individuos no relacionados.

Quizá la limitación de este trabajo, y en general la de todos los estudios de interacción génica, sea la necesidad de una significación estadística mucho

mayor que la habitualmente establecida, de manera que pueda soportar un test de Boferroni. La razón a esta precisión está en que al hacer muchas comparaciones, el azar por sí sólo puede explicar que alguna salga significativa. Por tal motivo debemos tomar con cautela algunas de las interacciones digénicas encontradas, sobre todo aquellas de $p > 0.01$. Puede que las diferencias encontradas entre este trabajo y el estudio preliminar publicado en 2006, respondan a esta consideración.

En efecto, en el artículo de Bone de 2006¹³⁷ se observaron dos patrones digénicos fuertemente asociados con OP: el ESR1-ESR2 y el ESR2-NRIP1, y sin embargo ahora no se presentan. Por el contrario, entonces no se encontraba relación con el gen de la aromatasa ni con el del FSHR y en esta tesis sí. Acaso se deba al aumento de la muestra poblacional y al cambio del método estadístico. En el presente estudio hemos ampliado además el número de interacciones, considerando un polimorfismo más en el gen de la aromatasa e introduciendo dos polimorfismos de un nuevo gen candidato, el BMP15.

Aunque en la mayoría de los casos, no encontramos relación estadísticamente significativa, sí observamos una interesante relación entre OP y la interacción de las siguientes variantes alélicas entre genes candidatos ya relacionados con la OP: del gen CYP19 UTR3'(AA) con el gen FSHR (AA y AS) ($p < 0.01$), entre nuevos genes candidatos (NRIP y BMP15): gen NRIP1 (tanto la variante GA como la GG) con el gen CYP19 UTR3' (variante GA) ($p < 0.04$) gen BMP15 marcador -9C>G (tanto la variante CC como GC) con el gen CYP19 IVS4 (11 y 22) ($p < 0.02$). Gen BMP15 AG (tanto la variante CC como la TC) con el gen FSHR (variantes AS y SS) ($p < 0.04$).

De estos resultados se desprende que los genes BMP15, CYP19 y NRIP, pero más concretamente las interacciones entre ellos, parecen ser los que más relacionados están con la predisposición a la OP, por encima de otros genes mucho más estudiados en la literatura (ESR1, ESR2). No obstante, insistimos en que la importancia global del estudio digénico entre estos genes con el desarrollo de esta enfermedad es limitada ya que sólo un porcentaje pequeño de las interacciones mostró asociación y ésta mostró un nivel de

significación escaso. Desconocemos además cómo se comportan las interacciones con otros genes candidatos clásicos (VDR, COLIA1, etc).

Es evidente que estos resultados refuerzan dos hipótesis planteadas en relación con la OP y que nos hemos fijado como objetivos principales: por un lado tenemos datos de que algunos polimorfismos genéticos en la ruta estrogénica están implicados en el desarrollo de la OP. Esta es la primera referencia también de que las variaciones de los nuevos genes candidatos (NRIP y BMP15) pueden predisponer a la OP como lo hicieron en otros procesos ginecológicos^{138, 139}. Por otra parte, tenemos nuevos argumentos para acentuar el carácter complejo y multifactorial de la OP, no sólo en la relación entre factores genéticos con ambientales, sino de los primeros entre sí. Al observar que existe interacción digénica que nos permite predecir en cierta medida si una está en riesgo de padecer OP, podemos avanzar un poco más y aventurar si la interacción entre alelos de más de dos genes candidatos (un análisis multilocus) puede precisarnos aún más la posible predisposición a padecer ésta y otras enfermedades comunes.

En consecuencia, la investigación genética representa ahora una de las más activas áreas dentro de la Ginecología y la Osteología. Aún cuando nos hallamos en fases preliminares, esperamos que entre de lleno en la práctica clínica de la OP. Detallar el mapa genético, y los polimorfismos o mutaciones que influyen sobre la DMO o el riesgo de padecer OP permitirá en un futuro conocer mejor su patogenia e identificar a individuos con alto riesgo de sufrir fracturas por fragilidad para así desarrollar programas de prevención individualizados y habilitar la *Medicina Predictiva*. También facultará anticipar respuestas o resistencias a los tratamientos convencionales y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas (Medicina Personalizada). Es pues una carrera por etapas en la que dejamos atrás aquella en la que se pensaba que todo podría resultar fácil con la determinación de un solo *loci*. Nos adentramos en la siguiente fase, donde impera conocer qué interacciones génicas existen, cuáles son sus relaciones con los factores ambientales y cómo explican la patogenia de la OP.

CONCLUSIONES

1.- Las características epidemiológicas de nuestra población de mujeres postmenopáusicas muestra un patrón similar al descrito en otros estudios, fundamentalmente en relación a factores de riesgo como el peso, la talla, el IMC, la edad de la menarquia, la edad de la menopausia y los hábitos tóxicos. Observamos una relación proporcional entre la magnitud de esos factores de riesgo y la gravedad de la osteopenia/osteoporosis.

2.- Existen otros factores alimenticios protectores de la OP como el consumo de fruta, verdura, cereales, más el consumo moderado de pescado, alcohol y lácteos, con la baja ingesta de carnes rojas. Igual que con los primeros, existe una relación proporcional entre la magnitud de estos factores alimenticios y la DMO, de tal manera que puede decirse que a mayor seguimiento de la “dieta mediterránea”, menor riesgo de osteoporosis.

3.- El trabajo es el primero que identifica los genes NRIP1 y BMP15 como nuevos *genes candidatos* para la OP.

4.- El análisis unilocus de los polimorfismos genéticos en los genes candidatos ESR1, ESR2, FSHR, CYP19A, NRIP1 y BMP15 nos muestra una gran heterogenicidad. La presencia de todos ellos en los tres grupos poblacionales (osteoporosis, osteopenia o normales) descarta que uno de ellos por si mismo determine la aparición de la OP.

5.- Este es el primer trabajo donde se considera al gen de BMP15 como nuevo gen candidato a la OP y se confirma la relación del gen de NRIP1, ya descrita en estudios preliminares de esta población.

6.- En el análisis digénico observamos una relación entre OP y la interacción de varias variantes alélicas, fundamentalmente de los genes de la aromatasa, el NRIP1 y el BMP15: Esto nos advierte de la naturaleza compleja de esta enfermedad y de la necesidad de enfocar diagnóstico genético hacia la

interacción de los distintos genes entre sí y de estos con los factores ambientales.

Referencias bibliográficas.

- ¹ Perez Cano R, Perez Temprano R. Osteoporosis: concepto, clasificación y fisiopatología. Protocolos de osteoporosis. SEMI
- ² International osteoporosis foundation. Informe sobre la osteoporosis en la comunidad europea: revisión de las recomendaciones de 1998. REEMO 2002;11:115-118
- ³ Nogués-Solan X. Epidemiología de la osteoporosis. Protocolos de osteoporosis de la SEMI
- ⁴ Díaz-Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez-Cano R, Rapado A, et al. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. Med Clin (Barc) 2001; 116: 86-8.
- ⁵ Cummings SR, Black DM, Rubin SM. Lifetime risks of hip, Colles', or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women. Arch Intern Med 1989; 149: 2445-8.
- ⁶ Serra JA, Garrida G, Vidan M, Maramon E, Branas F, Ortiz J. Epidemiología de la fractura de cadera en la ancianidad España. An Med Interna 2002; 19: 389-95.
- ⁷ O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. The prevalence of vertebral deformity in european men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. J Bone Miner Res 1996; 11: 1010-8.
- ⁸ Naves Díaz M, Díaz López JB, Gómez Alonso C, Altadill Arregui A, Rodríguez Rebollar A, Cannata Andia JB. Estudio de incidencia de fracturas osteoporóticas en una cohorte de individuos mayores de 50 años en Asturias tras 6 años de seguimiento. Med Clin (Barc) 2000; 115: 650-3.
- ⁹ Sosa M, Arbelo A, Láinez P, Navarro MC. Datos actualizados sobre la epidemiología de la fractura osteoporótica en España. Rev Esp Enf Metab Óseas 1998; 7: 174-9
- ¹⁰ Roberts SE, Goldacre. MJ. Time trends and demography of mortality after fractured neck of femur in an English population, 1968-98: database study. BMJ 2003; 327: 771-5.
- ¹¹ Gonzalez Macias J. Osteoporosis: Definición y etiología. Manual práctico de osteoporosis y metabolismo mineral. p 99-103.

-
- ¹² González Macías J. Osteoporosis. En: Rozman C, ed. Medicina Interna Farreras-Rozman. Harcourt. Madrid, 2004.
- ¹³ Seeman E, Hopper JL, Bach LA, Cooper ME, Parkinson E, McKay J, et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. N Engl J Med 1989; 320: 554-8.
- ¹⁴ Kelly PJ, Nguyen T, Hopper J, Pocock N, Sambrook P, Eisman J. Changes in axial bone density with age: a twin study. J Bone Miner Res 1993; 8: 11-7.
- ¹⁵ Efstathiadou Z, Tsatsoulis A, Ioannidis JPA. Association of collagen (1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: A meta-analysis. J Bone Miner Res 2001; 16: 1586-92.
- ¹⁶ Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med 2002; 346: 1513-21.
- ¹⁷ Canalis E. Regulation of bone remodeling. En: Murray JF, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (3^a ed.). Philadelphia: Lippincott, Raven 1996; 29-34.
- ¹⁸ Khosla S. The OPG/RANKL/RANK System. Endocrinology 2001; 142: 5050-5.
- ¹⁹ Vázquez Gámez MA, Montoya MJ, Gómez de Tejada MJ, et al. Niveles séricos de osteoprotegerina en mujeres sanas y osteoporóticas. REEMO 2003; 12(3): 63-7
- ²⁰ Checa MA. Anatomía, biología y homeostasis del hueso. Osteoporosis postmenopausica. Consenso del grupo de expertos. guía clinica de la AEEM. Barcelona 2002. p 9-16
- ²¹ Neyro J.L. Calidad ósea. Osteoporosis postmenopausica. Consenso del grupo de expertos. guía clinica de la AEEM. Barcelona 2002. p17-25
- ²² Gonzalez Macias J. Osteoporosis primaria: Epidemiología y diagnóstico. Manual práctico de osteoporosis y metabolismo mineral. p105-110.
- ²³ Quereda F. marcadores de remodelado óseo. Osteoporosis postmenopausica. Consenso del grupo de expertos. guía clinica de la AEEM. Barcelona 2002. p25-29

-
- ²⁴ Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TD. Risk factors for hip fracture in white women. Study of osteoporotic fractures Research group. *N Engl J Med* 1995;332(12): 767-73
- ²⁵ Osteoporosis postmenopáusica. Guía de Práctica Clínica. *Grupo de Trabajo de la SEIOMM**
- ²⁶ World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series 843. 1994. Geneva: WHO
- ²⁷ Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002;359:1929-36.
- ²⁸ Nelson HD, Helfand M, Woolf SH, Allan JD. Screening for postmenopausal osteoporosis: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002;137:529-42.
- ²⁹ Hernández Hernández JL. Factores de riesgo osteoporosis y fracturas. Manual práctico de osteoporosis y metabolismo mineral.p133-138
- ³⁰ Black DM, Steinbuch M, Palermo L, *et al.* An assessment tool for predicting fracture risk in postmenopausal women. *Osteopor Int* 2001;12:519-28.
- ³¹ Cummings SR, Melton LJ III. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002, 359: 1761-1767.
- ³² Geusens P, Hochberg MC, Van der Voort DJ, *et al.* Performance of risk indices for identifying low bone density in postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 2002;77:629-37.
- ³³ Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, Nevitt MC, Cummings SR; Osteoporotic Fractures Research Group. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res.* 2003 Nov;18(11):1947-54
- ³⁴ Bonaiuti D, Shea B, Iovine R, Negrini S, Robinson V, Kemper HC, Wells G, Tugwell P, Cranney A. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3):CD000333
- ³⁵ Cummings SR, Melton MJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002,359:1761-1767

-
- ³⁶ Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, Gillespie W, Weaver B, Zytaruk N, Cranney A, Adachi J, Tugwell P, Josse R, Greenwood C, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev.* 2002 Aug;23(4):560-9.
- ³⁷ Corwin RL, Hartman TJ, Maczuga SA, Graubard BI. Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III.. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1):159-65.
- ³⁸ Tucker KL, Hannan MT, Kiel DP. The acid-base hypothesis: diet and bone in the Framingham Osteoporosis Study. *Eur J Nutr.* 2001 Oct;40(5):231-7.
- ³⁹ Vazquez F. Tratamiento de la osteoporosis. Osteoporosis postmenopáusica. *Guía de la AEEM.*p73-78
- ⁴⁰ Lee LL, Lee JS, Waldman SD, Casper RF, Grynblas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model.*Bone.* 2002 Jun;30(6):917-23.
- ⁴¹ Lunt M, Masaryk P, Scheidt-Nave C, Nijs J, Poor G, Pols H, Falch JA, Hammermeister G, Reid DM, Benevolenskaya L, Weber K, Cannata J, O'Neill TW, Felsenberg D, Silman AJ, Reeve J. The effects of lifestyle, dietary dairy intake and diabetes on bone density and vertebral deformity prevalence: the EVOS study. *Osteoporos Int.* 2001;12(8):688-98
- ⁴² Roy DK, O'Neill TW, Finn JD, *et al.* Determinants of incident vertebral fracture in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteopor Int* 2003;14:19-26.
- ⁴³ Gonzalez Macias J. Osteoporosis: Definición y etiología. En: Riancho JA y González J. *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral.* Jarpyo editores. Madrid. 2004
- ⁴⁴ World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series 843. 1994. Geneva: WHO
- ⁴⁵ Osteoporosis postmenopáusica. Guía de Práctica Clínica. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Investigación Osea y Metabolismo Mineral. SEIOMM. Disponibles en www.SEIOMM.es

-
- ⁴⁵ Nieves JW, Barrett-Connor E, Siris ES, Zion M, Barlas S, Chen YT. Calcium and vitamin D intake influence bone mass, but not short-term fracture risk, in Caucasian postmenopausal women from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA) study. *Osteoporos Int*. 2007 Nov 13.
- ⁴⁶ Maggi S, Kelsey JL, Lituak J, Heyse SP. Incidence of hip fractures in the elderly: a cross-national analysis. *Osteoporos Int* 1991; 1: 232-241.
- ⁴⁷ Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2460-2466.
- ⁴⁸ Ongphiphadhanakul B. Osteoporosis: the role of genetics and the environment. *Forum Nutr*. 2007;60:158-67.
- ⁴⁹ Ferrari SL, Rizzoli R. Gene variants for osteoporosis and their pleiotropic effects in aging. *Molecular Aspects of Medicine* 2005; 26: 145-167.
- ⁵⁰ Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type 1 gene. *Nat genet* 1996; 14: 203-205.
- ⁵¹ Huang QY, Kung AW. Genetics of osteoporosis. *Mol Genet Metab*. 2006 Aug;88(4):295-306. Epub 2006 Jun 9.
- ⁵² Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2004 Sep;15(9):729-34.
- ⁵³ Albagha OM, Ralston SH. Genetics and osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006 Nov;32(4):659-80.
- ⁵⁴ Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS y Brown M. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*. 2006;38:1289-97.
- ⁵⁵ Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA y Safe S. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*. 2000;275:5379-87.
- ⁵⁶ Grumbach MM y Auchus RJ. Related Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:4677-94.

⁵⁷ Geng L, Yao Z, Yang H, Luo J, Han L, Lu Q. Association of CA repeat polymorphism in estrogen receptor beta gene with postmenopausal osteoporosis in Chinese. *J Genet Genomics*. 2007 Oct;34(10):868-76.

⁵⁸ Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005;161:307-20.

⁵⁹ Yamada Y, Ando F, Niino N, Ohta S y Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J Mol Med*. 2002;80:452-60.

⁶⁰ Zhao LJ, Liu PY, Long JR, Lu Y, Xu FH, Zhang YY, Shen H, Xiao P, Elze L, Recker RR y Deng HW. Test of linkage and/or association between the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density in Caucasian nuclear families. *Bone*. 2004;35:395-402.

⁶¹ van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, Colin EM, Fang Y, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA y Uitterlinden AG. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet*. 2003;12:1745-54.

⁶² Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE y Uitterlinden AG; GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*. 2004;292:2105-14.

⁶³ Ioannidis JP, Stavrou I, Trikalinos TA, Zois C, Brandi ML, Gennari L, Albagha O, Ralston SH y Tsatsoulis A. ER-alpha Genetics Meta-Analysis. 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*. 2002;17:2048-60.

⁶⁴ Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM y Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*. 2007;8:S14.

-
- ⁶⁵ Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H y Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet.* 1998;43:73-4.
- ⁶⁶ Sundarajan C, Liao WX, Roy AC y Ng SC. Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:135-9.
- ⁶⁷ Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, Lee J, Lui LY, Ziv E, Tice JA, Cummings SR y Rhee B. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106:273-80.
- ⁶⁸ Lee GH, Kim SH, Choi YM, Suh CS, Kim JG y Moon SY. Estrogen receptor beta gene+1730 G/A polymorphism in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007;88:785-8.
- ⁶⁹ Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M e Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem.* 2000;275:21372-9.
- ⁷⁰ Scariano JK, Simplicio SG, Montoya GD, Garry PJ y Baumgartner RN. Estrogen receptor beta dinucleotide (CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:501-8.
- ⁷¹ Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH y Karas RH, Mendelsohn ME, Housman DE, Levy D. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA.* 2003;290:2263-70.
- ⁷² Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehväslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I y de la Chapelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell.* 1995;82:959-68.
- ⁷³ Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu LL, Yaroslavskiy BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso-Landa L, Schaffler MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M. FSH directly regulates bone mass. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):247-60.

-
- ⁷⁴ Masi L, Becherini L, Gennari L, Amedei A, Colli E, Falchetti A, Farci M, Silvestri S, Gonnelli S y Brandi ML. Polymorphism of the aromatase gene in postmenopausal Italian women: distribution and correlation with bone mass and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2263-9.
- ⁷⁵ Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Pallonen H, Saarikoski S, Honkanen R y Mäenpää PH. Relation of aromatase gene polymorphism and hormone replacement therapy to serum estradiol levels, bone mineral density, and fracture risk in early postmenopausal women. *Ann Med.* 2003;35:282-8.
- ⁷⁶ Galán JJ, Buch B, Cruz N, Segura A, Morón FJ, Bassas L, Martínez-Pineiro L, Real LM y Ruiz A. Multilocus analyses of estrogen-related genes reveal involvement of the ESR1 gene in male infertility and the polygenic nature of the pathology. *Fertil Steril.* 2005;84:910-8.
- ⁷⁷ Gennari L, De Paola V, Merlotti D, Martini G, Nuti R. Steroid hormone receptor gene polymorphisms and osteoporosis: a pharmacogenomic review. *Expert Opin Pharmacother.* 2007 Apr;8(5):537-53.
- ⁷⁸ Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME y Ferrell RE. Vitamin D receptor and aromatase gene interaction and bone mass in older African-American women. *Metabolism.* 2003;52:521-3.
- ⁷⁹ Riancho JA. Polymorphisms in the CYP19 gene that influence bone mineral density. *Pharmacogenomics.* 2007 Apr;8(4):339-52.
- ⁸⁰ Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, Sañudo C, Mijares V, González-Macías J. A gene-to-gene interaction between aromatase and estrogen receptors influences bone mineral density. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:53-9.
- ⁸¹ Zhang YY, Long JR, Liu PY, Liu YJ, Shen H, Zhao LJ y Deng HW. Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: association study of healthy pre- and postmenopausal Chinese women. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:777-83.
- ⁸² Wang CL, Tang XY, Chen WQ, Su YX, Zhang CX, Chen YM. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007 Mar;18(3):295-305.

⁸³ Xu H, Long JR, Li MX y Deng HW. Interaction effects between estrogen receptor alpha and vitamin D receptor genes on age at menarche in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26:860-4.

⁸⁴ Brodowska A. The influence of hormonal replacement therapy on bone density in postmenopausal women depending on polymorphism of vitamin D receptor (VDR) and estrogen receptor (ER) genes. *Ann Acad Med Stetin.* 2003;49:111-30.

⁸⁶ Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 2005 Oct;20(10):1813-9.

⁸⁷ Chen YT, Miller PD, Barrett-Connor E, Weiss TW, Sajjan SG, Siris ES An approach for identifying postmenopausal women age 50-64 years at increased short-term risk for osteoporotic fracture. *Osteoporos Int.* 2007 Sep;18(9):1287-96

⁸⁸ Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR, Kapoor S. Symptoms in the menopausal transition: hormone and behavioral correlates. *Obstet Gynecol.* 2008 Jan;111(1):127-36

⁸⁹ Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR, Pien GW, Nelson DB, Sheng L. Symptoms associated with menopausal transition and reproductive hormones in midlife women. *Obstet Gynecol.* 2007 Aug;110(2 Pt 1):230-40

⁹⁰ Castelo-Branco C. Osteoporosis postmenopáusica. Guía clínica de la AEEM. Doctoral SL. Barcelona. 2006.

⁹¹ Tauchmanova L, Di Somma C, Rusciano A, Lombardi G, Colao A. The role for growth hormone in linking arthritis, osteoporosis, and body composition. *J Endocrinol Invest.* 2007;30(6 Suppl):35-41

⁹² Kontogianni MD, Dafni UG, Routsias JG, Skopouli FN. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004 Apr;19(4):546-51.

⁹³ Hamrick MW, Ferrari SL. Leptin and the sympathetic connection of fat to bone. *Osteoporos Int.* 2007 Oct 9

-
- ⁹⁴ Berard A, Bravo G, Gautier P. Meta-analysis of the effect of physical activity on the prevention of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* 1997; 7:331-337.
- ⁹⁵ Feskanich D, Willett W, Colditz G. Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA.* 2002 Nov 13;288(18):2300-6
- ⁹⁶ Informe salud y género 2005. Observatorio de la salud de la mujer. Ministerio de sanidad y consumo. Disponible en www.msc.es
- ⁹⁷ Cornuz J. Smoking, smoking cessation and risk of hip fracture in women; *Am J Med*;1999; 106; 311-4.
- ⁹⁸ Smoking status as a predictor of hip fracture risk in postmenopausal women of northwest Texas. *Prev Chronic Dis.* 2008 Jan;5(1):A09.
- ⁹⁹ Robbins J, Aragaki AK, Kooperberg C, Watts N, Wactawski-Wende J, Jackson RD, LeBoff MS, Lewis CE, Chen Z, Stefanick ML, Cauley J. Factors associated with 5-year risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA.* 2007 Nov 28;298(20):2389-98
- ¹⁰⁰ Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health* 2001,25(4):276-81
- ¹⁰¹ Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1995 Sep 1, 142 (5):485-92.
- ¹⁰² Berris KK, Repp AL, Kleerekoper M. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007 Dec;14(6):446-50.
- ¹⁰³ Petty SJ, O'Brien TJ, Wark JD. Anti-epileptic medication and bone health. *Osteoporosis Int.* 2007 Feb;18(2):129-42.
- ¹⁰⁴ Farhat G, Yamout B, Mikati MA, Demirjian S, Sawaya R, El-Hajj Fuleihan G. Effect of antiepileptic drugs on bone density in ambulatory patients. *Neurology.* 2002 May 14;58(9):1348-53.
- ¹⁰⁵ Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad de la UNESCO. Disponible en www.unesco.org

-
- ¹⁰⁶ Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Feb;19(1):63-8
- ¹⁰⁷ Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*. 2004 Sep 22;292(12):1440-6
- ¹⁰⁸ Schröder H. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem*. 2007 Mar;18(3):149-60.
- ¹⁰⁹ Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res*. 2007 Oct;51(10):1268-74
- ¹¹⁰ Kitchin B, Morgan SL. Not just calcium and vitamin D: other nutritional considerations in osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2007 Apr;9(1):85-92.
- ¹¹¹ Ward WE, Fonseca D. Soy isoflavones and fatty acids: effects on bone tissue postovariectomy in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2007 Jul;51(7):824-31
- ¹¹² Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2008 Feb;28(4):317-21
- ¹¹³ Lunt M, Masaryk P, Scheidt-Nave C, Nijs J, Poor G, Pols H, Falch JA, Hammermeister G, Reid DM, Benevolenskaya L, Weber K, Cannata J, O'Neill TW, Felsenberg D, Silman AJ, Reeve J. The effects of lifestyle, dietary dairy intake and diabetes on bone density and vertebral deformity prevalence: the EVOS study. *Osteoporos Int*. 2001;12(8):688-98
- ¹¹⁴ Cashman KD. Diet, nutrition, and bone health. *J Nutr*. 2007 Nov;137(11 Suppl):2507S-2512S
- ¹¹⁵ Puel C, Coxam V, Davicco MJ. Mediterranean diet and osteoporosis prevention. *Med Sci (Paris)*. 2007 Aug-Sep;23(8-9):756-60
- ¹¹⁶ Coxam V [New advances in osteoporosis nutritional prevention] *Med Sci (Paris)*. 2005 Mar;21(3):297-301
- ¹¹⁷ Gómez R, Magaña JJ, Cisneros B, Pérez-Salazar E, Faugeron S, Véliz D, Castro C, Rubio J, Casas L, Valdés-Flores M. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population. *Clin Genet*. 2007 Dec;72(6):574-81

-
- ¹¹⁸ Langdahl BL, Løkke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res.* 2000 Nov;15(11):2222-30.
- ¹¹⁹ Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, Falchetti A, Gonnelli S, Fiorelli G, Tanini A, Brandi ML. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet.* 2000 Aug 12;9(13):2043-50.
- ¹²⁰ Geng L, Yao Z, Yang H, Luo J, Han L, Lu Q. Association of CA repeat polymorphism in estrogen receptor beta gene with postmenopausal osteoporosis in Chinese. *J Genet Genomics.* 2007 Oct;34(10):868-76
- ¹²¹ Greendale GA, Chu J, Ferrell R, Randolph JF Jr, Johnston JM, Sowers MR. The association of bone mineral density with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med.* 2006 Sep;119(9 Suppl 1):S79-86
- ¹²² Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu LL, Yaroslavskiy BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso-Landa L, Schaffler MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M. FSH directly regulates bone mass. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):247-60
- ¹²³ Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, Sañudo C, Hernández JL, Amado JA, Zarrabeitia A, González-Macías J. Aromatase gene and osteoporosis: relationship of ten polymorphic loci with bone mineral density. *Bone.* 2005 May;36(5):917-25.
- ¹²⁴ Galan JJ, Buch B, Cruz N, Segura A, Moron FJ, Bassas L, Martinez-Pineiro L, Real LM, Ruiz A. Multilocus analyses of estrogen-related genes reveal involvement of the ESR1 gene in male infertility and the polygenic nature of the pathology. *Fertil Steril.* 2005 Oct;84(4):910-8
- ¹²⁵ Caballero V, Ruiz R, Sainz JA, Cruz M, López-Nevot MA, Galán JJ, Real LM, de Castro F, López-Villaverde V, Ruiz A. Preliminary molecular genetic analysis of the Receptor Interacting Protein 140 (RIP140) in women affected by endometriosis. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2005 Aug 30;2:11

¹²⁶González A, Ramírez-Lorca R, Calatayud C, et al. Association of genetic markers within the BMP15 gene with anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2007 Sep 28.

¹²⁷ Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1976-9

¹²⁸ Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:739-44.

¹²⁹Morón FJ, Mendoza N, Quereda F, et al. Pyrosequencing technology for automated detection of the BMP15 A180T variant in Spanish postmenopausal women. *Clin Chem*. 2007 Jun;53(6):1162-4.

¹³⁰ [Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME y Ferrell RE.](#) Vitamin D receptor and aromatase gene interaction and bone mass in older African-American women. *Metabolism*. 2003;52:521-3.

¹³¹ [Zhang YY, Long JR, Liu PY, et al.](#) Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: association study of healthy pre- and postmenopausal Chinese women. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:777-83.

¹³² Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, et al. A gene-to-gene interaction between aromatase and estrogen receptors influences bone mineral density. *Eur J Endocrinol*. 2006;155:53-9.

¹³³ [Rivadeneira F, van Meurs JB, Kant J, et al.](#) Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1443-56.

¹³⁴ . Mendoza N, Morón FJ, Quereda F, et al. A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci*. 2008

¹³⁵ Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, et al. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod.* 2006;21:554-7.

¹³⁶ Chang HW, Chuang LY, Ho CH, Chang PL, Yang CH. Odds ratio-based genetic algorithms for generating SNP barcodes of genotypes to predict disease susceptibility. *OMICS.* 2008;12:71-81.

¹³⁷ [Morón FJ, Mendoza N, Vázquez F, Molero E, Quereda F, Salinas A, Fontes J, Martínez-Astorquiza T, Sánchez-Borrego R, Ruiz A.](#) Multilocus analysis of estrogen-related genes in Spanish postmenopausal women suggests an interactive role of ESR1, ESR2 and NRIP1 genes in the pathogenesis of osteoporosis. *Bone.* 2006 Jul;39(1):213-21. Epub 2006 Mar 10.

¹³⁸ Morón FJ, Mendoza N, Quereda F, et al. Pyrosequencing technology for automated detection of the BMP15 A180T variant in Spanish postmenopausal women. *Clin Chem.* 2007 Jun;53(6):1162-4.

¹³⁹ González A, Ramírez-Lorca R, Calatayud C, et al. Association of genetic markers within the BMP15 gene with anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2007 Sep 28.