

ARTÍCULO ORIGINAL

Polimorfismos del gen VDR en el riesgo de fracturas osteoporótica de cadera en una población adulta española
VDR gene polymorphisms on risk of osteoporotic hip fracture in an adult population spanish

***Rojo Venegas K¹, Aguilera M¹, Cañadas Garre M¹, Eisman JA², García A³, López JM⁴, Llamas JM⁴, Martínez JL⁵, López-Mezquita B⁵, Calleja MA¹**

¹Unidad de Farmacogenética. Servicio de farmacia. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

²Universidad New South Wales. Hospital St Vincent's. Bone Research Program-Garvan Institute of Medical Research, Sydney, Australia

³Servicio de Reumatología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

⁴Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

⁵Servicio de Traumatología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

krojo@correo.ugr.es

RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad esquelética compleja multifactorial con un fuerte componente genético, caracterizada por un deterioro en la microestructura ósea que causa fragilidad ósea y un incremento en el riesgo de fracturas osteoporóticas. El gen VDR podría estar fuertemente involucrado en el riesgo de fractura. El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación entre polimorfismos del gen VDR y la susceptibilidad a fractura de cadera (FC). Se reclutaron 147 pacientes andaluces (102 con factores de riesgos de fracturas osteoporóticas y 45 con metabolismo óseo normal). El aislamiento de ADN se realizó a partir de 300 mL de sangre, genotipando 2 SNPs: BsmI y FokI mediante PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism). Todas las fracturas fueron confirmadas por rayos-X mientras que el riesgo de fracturas a través de la escala FRAX y DMO. Los resultados se evaluaron estadísticamente, considerando significativo valores de $p < 0,05$. La edad media de los pacientes fracturados fue de 68,5 años, cuyas frecuencias alélicas fueron 64.7% G y 68.6% C para BsmI y FokI, respectivamente. La prevalencia de estos SNPs en la población caso fueron: 43,3% GA, 43,3% GG y 13,7% AA para BsmI y 49,0% CC, 39,20% CT, 11,8% TT para FokI. Las frecuencias de los alelos y genotipos no mostraron diferencias entre pacientes con riesgo de fracturas y pacientes control. Las frecuencias están acorde con las demostradas en HapMap para población europea-caucásica. No se encontró ninguna asociación significativa entre estos SNPs y la susceptibilidad a las FC en la población adulta andaluza.

PALABRAS CLAVE: BsmI - FokI - Fracturas de cadera - Gen VDR - polimorfismos - Osteoporosis.

ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial complex skeletal disease with strong genetic component, characterized by a deterioration of bone microstructure that causes bone fragility and an increased risk of osteoporotic fractures. VDR gene could be strongly involved in the risk of fracture. The aim of this study was to investigate the association between VDR gene polymorphisms and susceptibility to hip fracture (HF). 147 Andalusian patients were recruited (102 with risk factors for osteoporotic fractures and 47 with normal bone metabolism). DNA isolation was performed from 300 mL of blood, genotyping 2 SNPs: BsmI and FokI by PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism). All fractures were confirmed by X-rays while the risk of fractures through FRAX level and BMD. The results were statistically evaluated, considering significant p-values < 0.05 . The average age of fractured patients was 68.5 years, whose allele frequencies were 64.7% G and 68.6% C for BsmI and FokI, respectively. Prevalence of these SNPs in the case population were: 43.3% GA, 43.3% GG and 13.7% AA BsmI and 49.0 % CC, 39.2% CT, 11.8% TT for FokI. The frequencies of

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 193-201

alleles and genotypes showed no differences between patients with and without risk of hip fracture. The frequencies are agree to HapMap for European-Caucasian population. It was found no significant association between these SNPs and susceptibility to HF in the adult population of Andalusia.

KEYWORDS: BsmI - FokI - Hip fracture - VDR Gene - polymorphisms - Osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por una baja densidad mineral ósea (DMO) y cambios estructurales en la microestructura del tejido óseo, con la consecuente fragilidad ósea y aumento del riesgo de fracturas osteoporóticas.¹

La fractura de cadera (FC) es la fractura osteoporóticas más temida debido a su alta mortalidad que puede llegar alcanzar el 30% en el primer año de la fractura.² Además, el 40% de las personas que sobrevive no recupera su estado previo y comienzan a depender de terceras personas para sus actividades diarias.³

Debido a que la osteoporosis es una enfermedad poligénica (compleja, multifactorial),⁴ la probabilidad individual de tener una fractura depende de la combinación de varios factores de riesgo, como caídas, baja DMO y factores genéticos.^{5,6,7} Esta última juega un papel fundamental en la predicción de fracturas de cadera y valores de la DMO.⁸

Previos estudios genéticos en la osteoporosis han focalizado a la DMO como un fuerte componente genético y el predictor más influyente del riesgo de fracturas.^{9,10,11,12} Estos estudios han sido desarrollados por la evidencia de que las características del hueso han demostrado ser altamente heredables in gemelos y familias.^{10,13}

Dado que la osteoporosis tiene un fenotipo complejo y variable, y debido a su interés epidemiológico, se han buscado muchos factores causales para establecer una asociación entre genes específicos responsables o grupos de genes cuyos efectos podrían interactuar.^{13,14} En este sentido, el gen receptor de la vitamina (VDR) es uno de los genes que podría estar fuertemente involucrado en la DMO y riesgo de FC,¹⁵ y ha sido el primer gen candidato estudiado con el propósito de establecer una asociación genética.¹⁶

La vitamina D es un cofactor importante que estimula la absorción de calcio en el intestino y su reabsorción en los riñones, y desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio y fósforo, así como también en el metabolismo mineral óseo.¹⁷

Varios estudios han mostrado resultados controvertidos sobre la asociación entre polimorfismos (SNPs) del gen VDR y el riesgo de fracturas. Los 5 SNPs del gen VDR (*BsmI*, *TaqI*, *Cdx2*, *Apal*, *FokI*) han sido propuestos para ser asociados a la DMO y riesgo de fractura. Sin embargo, recientes meta-análisis en estos SNP no han logrado un acuerdo sobre la existencia de asociación, ya que mientras algunos han encontrado una fuerte asociación,^{18,19} otros estudios no han encontrado ninguna relación.^{20,21}

El presente trabajo evaluó la influencia de relevancia clínica de 2 SNP del gen VDR con la susceptibilidad al riesgo de fracturas de cadera en una población caucásica-española.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio:

El diseño del estudio fue un caso-control. Los pacientes eran de origen caucásicos (españoles) y reclutados en el hospital Universitario Virgen de las Nieves. El grupo caso se reclutó de los servicios de Traumatología-Cirugía Ortopédica y Reumatología, mientras que el grupo control se reclutaron de los servicios de Reumatología y Medicina Nuclear.

El grupo caso estaba constituido por pacientes mayores de 55 años con altos factores de riesgo de fracturas (de acuerdo a la escala de FRAX), con DMO de osteopenia (T-score entre -1 y -2.5) y/o con osteoporosis (T-score \leq -2.5).

El grupo control estaba constituido por pacientes mayores de 55 años, no institucionalizados, funcionalmente independientes. Se excluyeron aquellos con: fracturas de cadera previa, artritis reumatoides, diabetes tipo 1, hiperparatoroidismo, enfermedades del metabolismo mineral óseo, fibrosis quística, hipogonadismo o menopausia precoz (antes de los 45 años), enfermedad nutricional o mala absorción, enfermedad hepática crónica, fármacos con efecto sobre el metabolismo óseo en los últimos 3 años (calcio, vitamina D, antirresortivo, anabolizantes, etc.)

El estudio fue aprobado por el Comité Ética de Investigación Clínica del hospital de acuerdo a la Declaración de Helsinki y la Ley Española de Investigación Biomédica. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes para la participación del estudio.

Análisis de SNPs/Genotipado.

Para evaluar la asociación de los polimorfismos con las variantes fenotípicas se genotiparon los polimorfismos de la siguiente manera:

Las muestras de sangre (3 ml) fueron recolectadas en tubos BD Vacutainer® K3E (BD, Plymouth, Reino Unido), y se extrajo el ADN a partir de células blancas mediante el Kit QIAamp® DNA Mini Kit (GmbH Qiagen, Hilden, Alemania). La calidad del ADN se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

En todos los polimorfismos la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó en el Applied Biosystems 2720 Termociclador (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) en tubos separados para cada polimorfismo en un volumen final de 25 μ L, que contenía 50 ng de ADN. Polimorfismos VDR (rs1544410-*BsmI*, rs10735810-*FokI*) se determinaron por PCR-RFLP. La reacción de amplificación de ambos polimorfismos fue: 200 dNTPs nM (Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.), 400 nM de cada primer, 4 mM de MgCl₂, 1x PCR Buffer II y 0,15 U de AmpliTaq Gold (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EE.UU.). Programa de amplificación fue realizada por un touchdown PCR, con un paso de desnaturalización inicial de 15 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 60 segundos a 65-55 °C (la temperatura de annealing disminuyó en 0,5 °C cada ciclo), 30 seg a

72°C, y un paso de elongación final de 7 min a 72 °C.

El ADN amplificado fue digerido con la correspondiente enzima de restricción durante toda la noche, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (New England Biolabs Inc ®, Massachusetts, EE.UU.). Los fragmentos de la digestión se analizaron en 3,5 a 4,5% en gel de agarosa con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Todos los resultados fueron confirmados por secuenciación.

Medidas clínicas

Para evaluar los parámetros clínicos y determinar el riesgo de fractura de cadera, se realizó una medición del índice de masa corporal (IMC) y del estado mineral de los huesos de la DMO (g/cm^2) en cada paciente.

Para ambos grupos, la medición de la DMO del cuello femoral (FN) y la columna lumbar (LS, L2-L4) se midieron a través del equipo scanner densitométrico Hologic QDR 4500 C (Hologic, Bedford, MA, EE.UU.). El escáner fue calibrado diariamente con fantomas apropiado. Las mediciones fueron tomadas desde el lado derecho de la fractura de cadera en el grupo casos (en caso de prótesis que se midió en la cadera izquierda) y de la cadera derecha en el grupo control.

Mediciones antropométricas de peso y altura fueron medidas con una balanza calibrada y una regla de pared. El índice de masa corporal (IMC , kg/m^2) fue calculado como el peso (kg) dividido por la altura al cuadrado (m^2). Todas las fracturas fueron confirmadas por rayos X, y los factores de riesgo se calcularon mediante el índice FRAX.

Métodos estadísticos:

Todos los resultados de genotipado fueron comprobados utilizando la herramienta calculadora de equilibrio Hardy-Weinberg.²² El cálculo estadístico se realizó con el software SPSS (versión 15, SPSS, Inc. Chicago, Illinois, EE.UU.). También se utilizó el Programa Epidemiológico EPIDAT (versión 3.1, Galicia, España) para comparar la distribución de los alelos. La prueba de Pearson- χ^2 se utilizó para comparar la distribución de los genotipos en ambos grupos. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Datos clínicos:

147 fueron incluidos en el estudio. 102 fueron pacientes del grupo caso (92 mujeres y 10 hombres), con una edad promedio de 68 años, 50 de los cuales habían sufrido un fractura de cadera debido a un traumatismo simple. El grupo control estuvo constituido por 45 pacientes sanos (41 mujeres y 4 hombres) con una edad promedio de 66 años.

Un resumen de las características clínicas de ambos grupos se muestra en la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas en las edades ni en el IMC, pero los pacientes del grupo caso tenían menor peso y altura que el grupo control.

Tabla 1.- Comparación de características clínicas en pacientes caso y control.

Características clínicas	Grupo Caso	Grupo Control	valor P
Edad (años)	68,55±9,10	66,00±3,36	0,071
Peso (kg)	68,66±11,15	80,60±14,71	<0,001
Altura (cm)	1,54±0,07	1,62±0,07	<0,001
IMC (kg/cm ²)	28,67±4,86	30,67±5,21	0,026

Distribución del genotipado:

Las frecuencias del genotipo de los 2 SNPs estudiados se muestran en la Tabla 2. La distribución de los alelos en los dos grupos de estudio estaba acorde con el equilibrio Hardy-Weinberg.

Los polimorfismos *BsmI* (G63980A) y *FokI* (T2C) mostraron prácticamente las mismas frecuencias entre los diferentes grupos. No se encontró diferencias significativas entre el grupo caso y control. El análisis combinado de los dos marcadores polimórficos (haplotipos) no mostró asociación relevante entre ambos grupos.

Tabla 2. Genotipos y frecuencias alélicas en el grupo caso y control de los polimorfismos del gen receptor de vitamina D (VDR).

Gen (SNP, posición)	Genotipo /alelo	Grupo Caso n (%)	Grupo Control n (%)	Chi square	valor p
VDR (<i>BsmI</i> -rs1544410, G63980A)	GG	44 (43,1)	19 (42,2)	0,42	0,810
	GA	44 (43,1)	18 (40,0)		
	AA	14 (13,7)	8 (17,8)		
	G	132 (64,7)	56 (62,2)	0,07	0,781
	A	72 (35,3)	34 (37,8)		
VDR (<i>FokI</i> -rs10735810, T2C)	CC	50 (49,0)	19 (42,2)	0,73	0,696
	CT	40 (39,2)	19 (42,2)		
	TT	12 (11,8)	7 (15,6)		
	C	140 (68,6)	57 (63,3)	0,57	0,450
	T	64 (31,4)	33 (36,7)		

DISCUSIÓN

La investigación sobre enfermedades complejas y multifactoriales, como la osteoporosis, ha sido objeto para el establecimiento de estudios con impacto entre asociaciones genéticas y factores ambientales.⁴ La detección temprana de una predisposición genética a la osteoporosis permitiría una prevención adecuada, y/o la demora en los cambios desfavorables de los tejidos óseos. El análisis de polimorfismos validados, así como también la aplicación de eficaces herramientas de diagnóstico de genotipo contribuiría a dar imagen relativa de susceptibilidad de fracturas osteoporóticas.⁸

En nuestro estudio, hemos contribuido y evaluado la influencia de la relevancia clínica de los polimorfismos del gen VDR en el riesgo de fractura de cadera. De acuerdo con nuestros datos generales, y tal como se esperaba los pacientes con factores de riesgo de fractura de cadera presentaron menor DMO que el grupo control, a pesar de la misma edad. En ambos SNPs, la distribución de las frecuencias de genotipado no mostró diferencias significativamente entre el grupo caso y control.

Estos hallazgos han sido ampliamente discutidos en estudio de la genética osteoporosis. Por ejemplo, la existencia de una asociación de genotipos de VDR con DMO y la osteoporosis ha sido un punto de discusión y controversia en numerosos estudios^{18,19,20,21,23,24,25,26,27,28} por lo tanto, ha sido difícil discutir los resultados presentes en nuestra población de estudio con los anteriores datos publicados.

Nosotros no encontramos diferencias significativas en las frecuencia del SNP *BsmI* entre el grupo caso y control (Tabla 2). Estos datos están de acuerdo con el estudio multicéntrico GENOMOS (9 equipos de investigación europeos) donde los autores no encontraron ninguna asociación significativa.²⁰ De la misma manera, un meta-análisis (1,632 casos de fracturas y los controles de 5323) que evaluó el efecto genético y el riesgo de fractura asociados al SNP *BsmI* tampoco encontró ninguna asociación.²¹

En otro estudio de meta-análisis que incluyó 17 estudios de poblaciones caucásicas, no se encontró ninguna asociación, aunque una modesta diferencia entre la FC y el genotipo GG del SNP *BsmI*.^{Error! Marcador no definido.} Del mismo modo, en un estudio caso-control no se encontró asociación entre este SNP y los parámetros de DMO y fracturas de cadera.²⁴

Otros estudios similares realizados en mujeres posmenopáusicas osteoporóticas y mujeres normales, encontraron una asociación entre este SNP y el riesgo de fractura, pero era independiente de la pérdida de DMO.^{17,25}

Por otra parte, en el proyecto Nurses Healthy, que incluían mujeres posmenopáusicas de 43 a 69 años de edad, se demostró que el genotipo AA del SNP *BsmI* estaba asociado con más del doble del incremento en el riesgo de fractura de cadera en comparación con el genotipo GG.^{26,27}

Nosotros no encontramos ninguna diferencia significativa entre el genotipo *FokI* y el riesgo de fractura de cadera. Un meta-análisis realizado en una población con riesgo de fracturas, no encontró ninguna diferencia significativa del SNP *FokI* con la incidencia de fractura.²³ Asimismo, otro estudio no encontró ninguna asociación en mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas con o sin osteoporosis y este último SNP.²⁷

Por último, considerando el poder estadístico de los polimorfismos estudiados, se concluye que al parecer no existe una influencia genética sobre la incidencia del riesgo de fractura de cadera en esta población.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al equipo médico del servicio de Traumatología y Reumatología, a los técnicos del Servicio de Medicina Nuclear y a las enfermeras del Servicio de Análisis.

BIBLIOGRAFIA

1. National Institutes of Health (USA). Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. *JAMA*. 285(6), 785-795 (2001).
2. Franzo A, Francescutti C, Simon G. Risk factors correlated with post operative mortality for hip fracture surgery in the elderly: a population-based approach. *Eur J Epidemiol* 2005; 20(12), 985-991.
3. National Osteoporosis Foundation (NOF). Clinical's Guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington, DC. National Osteoporosis Foundation 2008. Disponible en: www.nof.org/professionals/Clinicians_Guide.htm (Acceso el enero 2011).
4. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2460–2466.
5. Nguyen ND, Eisman JA, Center JR, et al. Risk factors for fracture in osteoporotic men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92, 955-962.
6. Rojo-Venegas K, Aznarte-Padial P, et al. Factors of risk in an elderly population: Evaluation scales for the prevention of hip fractures. *Rev Esp Cir Ortp Traumatol* 2010, 54(3), 167-173.
7. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1995; 332:767-773.
8. Rojo Karen, Aguilera M, Eisman J, et al. Pharmacogenetics of osteoporosis-related bone fractures: moving towards the harmonization and validation of polymorphism diagnostic tools. *Pharmacogenomics* 2010; 11(9), 1287–1303.
9. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002; 359: 1929-1936.
10. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 1987; 80:706–710.
11. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M, et al. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int* 1996; 6:178–182.
12. Uitterlinden A, Pols H. Manual Práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral: Genética de la Osteoporosis. ISBN: 84-88992-91-2. Cap 10, 49-54 (2004). Disponible en: www.medicrit.com/libros/OSTEOPOROSIS/49.pdf. (Acceso en enero 2011).
13. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman J. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? *Am J Epidemiol* 1998; 147: 3–16.
14. Chen Y, Shen H, Yang F, et al. Choice of study phenotype in osteoporosis genetic research. *J Bone Miner Metab* 2009; 27: 121-126.
15. Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Pharmacogenetics of osteoporosis and the prospect of individualized prognosis and individualized therapy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(6),481–488.
16. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.
17. Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *J Bone Miner Res* 2007; 22: V2–V10.
18. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1841-1849.
19. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 419-428.
20. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006; 145: 255-264.
21. Fang Y, Rivadeneira F, Van Meurs JB, et al. Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 2006; 39: 938-945.
22. Rodriguez S, Gaunt T, Day I. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological

- Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol.* 2009; 169(4): 505–514.
23. Ji GR, Yao M, Sun CY, Li ZH, Han Z. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: A meta-analysis. *Bone* 2010; 47: 681-686.
 24. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Boonen S. Polymorphisms of the VDR, ER and COLIA1 genes and osteoporotic hip fracture in elderly postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2000; 11: 583-591.
 25. Garnero P, Muñoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with the Risk of Fractures in Postmenopausal Women, Independently of Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4829–4835.
 26. Feskanich D, Hunter DJ, Willett WC, Hankinson SE, Hollis BW, Hough HL, et al. Vitamin D receptor genotype and the risk of bone fractures in women. *Epidemiology* 1998; 9: 535-539.
 27. Mencej S, Preželj J, Kocijancic A, Kocjan T, Teskac K, Ostanek B, et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumor necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *J Mol Endocrinol* 2009; 42, 239-247.
 28. Horst-Sikorska W, Kalak R, Wawrzyniak A, Marcinkowska M, Celczynska-Bajew L, Slomski R. Association analysis of the polymorphisms of the VDR gene with bone mineral density and the occurrence of fractures. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 310-319.
-