

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ALELOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y SU RELACION
CON LA DENSIDAD MINERAL OSEA

POR

GILBERTO JARAMILLO RANGEL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

FEBRERO, 1996

TM

RC93

.073

J3

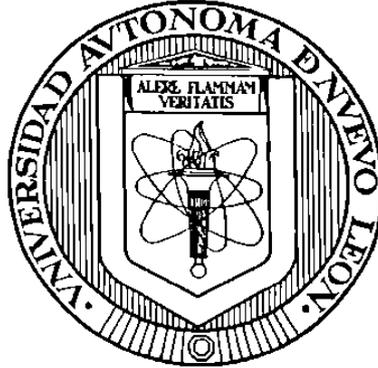
c.1



1080071653

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ALELOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y SU RELACION
CON LA DENSIDAD MINERAL OSEA**

Por

GILBERTO JARAMILLO RANGEL

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

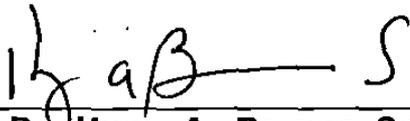
Febrero, 1996

TM
RC931
.073
13

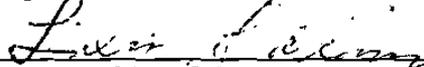


ALELOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D y SU RELACION CON LA DENSIDAD MINERAL OSEA

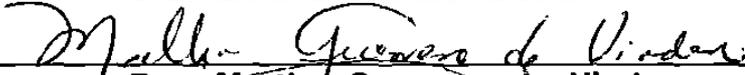
Aprobación de Tesis:



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña. Asesor de tesis



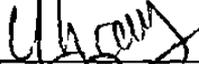
Dra. Lilia Cárdenas Ibarra.



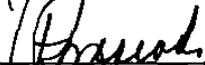
Dra. Martha Guerrero de Viader.



Dr. José María Viader Salvadó.



Dr. Mario A. Garza Elizondo.



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

A mis padres Gilberto Jaramillo Cardona y Ma. del Refugio Rangel Rosas. Gracias por ser un ejemplo diario de trabajo y bondad y por enseñarme que importan mucho más los hechos que las palabras.

A mis hermanos Lidia, Carmen, David, Cuquis y Julio por su apoyo incondicional, su amistad, por hacer tan agradables los momentos que pasamos juntos.

A los nuevos integrantes de la familia: Samuelin, Valeria, David Alejandro, Elena y Miguel.

Al resto de mi familia.

A todos mis **amigas** y **amigos**, gracias por sus palabras de aliento y comprensión en momentos difíciles.

Por último, a Marta, que independientemente de lo que nos reserve el destino, ya forma una parte muy importante de mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por su valiosa asesoría y las muchas facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A la Dra. Lilia Cárdenas Ibarra, por su invaluable ayuda en los aspectos estadísticos y clínicos de esta tesis.

Al Dr. Juan A. Tamayo y Orozco y el personal de COMOP por facilitarnos los datos y muestras sanguíneas de las personas incluidas en el estudio.

Al Dr. Nigel Morrison, por proporcionarnos las secuencias de los iniciadores utilizados en el proyecto y sus valiosos comentarios respecto al mismo.

Al Dr. José Ma. Viader Salvadó, la Dra. Martha Guerrero de Viader y el Dr. Mario A. Garza Elizondo por sus acertados comentarios, los cuales contribuyeron al mejoramiento de este proyecto.

A todos mis compañeros de la ULIEG (estudiantes, trabajadores, maestros, secretarias, personal de intendencia, etc.) por sus enseñanzas y la ayuda que muchas veces me brindaron durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgó.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Dinamismo del Sistema Esquelético	1
1.2 Importancia de la Osteoporosis como Problema de Salud Pública	2
1.3 Causas de la Osteoporosis	2
1.4 Efecto del Ambiente en los Orígenes de la Osteoporosis	3
1.5 La influencia Genética en la Densidad Mineral Osea	5
1.6 Alelos del gen del Receptor de la Vitamina D y Niveles de Osteocalcina	7
1.7 Alelos del gen del Receptor de la Vitamina D y Densidad Mineral Osea	7
2. HIPOTESIS	9
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1 Características del Estudio	12
3.1.1 Sujetos Incluidos	12
3.1.2 Criterios de Exclusión	12
3.1.3 Tamaño de Muestra	13
3.1.4 Determinaciones	14
3.2 Determinación de Polimorfismos en el gen RVD . .	14
3.2.1 Extracción de DNA	14
3.2.1.1 Fenol-Sevag	15
3.2.1.2 TSNT	16
3.2.1.3 Desalado (Salting-out)	17

Capítulo	Página
3.2.1.4 Espectrofotometría	18
3.2.1.5 Electroforesis en gel de Agarosa	18
3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	19
3.2.3 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción	23
3.3 Densitometrías Oseas y Factores no Genéticos Asociados con Osteoporosis	26
3.4 Métodos Estadísticos	26
3.4 Origen de los Reactivos y Materiales Utilizados	27
4. RESULTADOS	29
4.1 Respuesta a Participar en el Estudio	29
4.2 Características Generales del Grupo Estudiado	29
4.3 Análisis del DNA	30
4.4 Densitometrías Oseas	31
4.5 Análisis de Varianza y de Correlación	31
4.6 Análisis de Regresión Múltiple	32
5. DISCUSION	33
6. CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Secuencia de los Oligonucleótidos Iniciadores para la Región 3' del gen RVD.	21
II. Respuesta a Participar en el Estudio.	39
III. Características Generales del Grupo Estudiado.	40
IV. Frecuencias Alélicas del gen RVD.	41
V. Densitometrías Oseas.	42
VI. Análisis de Varianzas.	43
VII. Análisis de Correlación.	44
VIII. Regresiones Múltiples.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrategia General	11
2	Reaccion en Cadena de la Polimerasa	20
3	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restriccion	24
4	Análisis del DNA	38

NOMENCLATURA

A,a,B,b,T,t	Alelos del gen del Receptor de la Vitamina D Discernibles con <i>Apa</i> I (A,a), <i>Bsm</i> I (B,b) y <i>Taq</i> I (T,t)
ANOVA	Análisis de Varianza
<i>Apa</i> I	Endonucleasa de Restricción Obtenida de <i>Acetobacter pasteurians</i>
α	Valor Fijado Para Evitar el Error Estadístico Tipo I
<i>Bsm</i> I	Endonucleasa de Restricción Obtenida de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
β	Valor Fijado Para Evitar el Error Estadístico Tipo II
°C	Grados Centrígados
cm ²	Centímetros cuadrados
cols	Colaboradores
DEC	Desviación Estándar Común
DMO	Densidad Mineral Osea
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de Desoxinucleósidos

DO	Densidad Optica
Δr^2	Cambio en el Coeficiente de Determinación
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
g	Número de Veces la Fuerza de Gravedad
gr	Gramos
M	Concentración Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Concentración Micromolar
n	Número de Muestra
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nuc	Nucleótidos
p	Significancia Estadística

pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
PI	Indice de Probabilidad
RFLP's	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rm	Coefficiente de Regresión Múltiple
RNA	Acido Ribonucleico
RNAasas	Enzimas que Digieren el Acido Ribonucleico
RNAm	Acido Ribonucleico Mensajero
RVD	Receptor de la Vitamina D
<i>Taq</i> I	Endonucleasa de Restricción Obtenida de <i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la Concentración

RESUMEN

Gilberto Jaramillo Rangel

Fecha de Graduación: Febrero, 1996

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: ALELOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y SU RELACION CON LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA

Número de páginas: 50

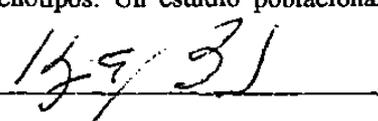
Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Area de Estudio: Medicina Molecular

Propósito y Método del Estudio: La osteoporosis se caracteriza por reducción en la densidad mineral ósea (DMO), lo que conduce a una mayor susceptibilidad a fracturas ante trauma mínimo. Este padecimiento es mucho más frecuente en las mujeres, de las cuales el 40% de las mayores de 60 años presentan evidencia de DMO disminuída por absorciometría. El pico de DMO y el ritmo de pérdida mineral anual están determinados genéticamente hasta en un 80%. Por otro lado, la edad, la menopausia, la ingesta de calcio, el peso corporal, el sedentarismo y el consumo de alcohol y tabaco, se han relacionado con la osteoporosis. Recientemente, se ha atribuido a polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D (RVD) el 75% del efecto genético en la DMO. Este hallazgo es importante, ya que abre la posibilidad de predecir oportunamente qué personas tienen mayor probabilidad de padecer osteoporosis en la etapa madura de la vida, mediante la tipificación de alelos del gen RVD. En Latinoamérica aun no hay estudios en este respecto. El objetivo del presente trabajo fue investigar la posible asociación de los alelos del gen RVD con la DMO en mujeres mexicanas. Para ello, se realizó un estudio transversal-observacional con personas reclutadas en la ciudad de México, D.F. Fueron elegibles mujeres no embarazadas ni lactando, mayores de 25 años, sin diagnóstico previo de osteoporosis ni enfermedades que alteren la DMO. Los alelos del gen RVD, definidos por las endonucleasas de restricción *Apa I*, *Bsm I* y *Taq I*, se determinaron por PCR-RFLP's. La DMO se midió por DEXA 1000 en columna (L2-L4) y fémur (trocánter, triángulo de Wards y cuello). Edad, peso, talla, menopausia, paridad, lactancia, uso de estrógenos, calcio suplementario, ejercicio, tabaquismo y consumo de alcohol se indagaron por un cuestionario autoadministrado.

Contribuciones y Conclusiones: Se analizaron el genotipo y la DMO en 99 voluntarias. *Bsm I* y *Taq I* identificaron en la muestra la existencia de tan solo el 6% de BB (homocigotos para la ausencia de corte) y el 3% de tt (homocigotos para la presencia de corte) respectivamente, por lo que su escasa representatividad imposibilitó el contraste; en cambio *Apa I* identificó el homocigoto AA en el 18% de las mujeres y el aa en el 26% de éstas. Las diferencias en las medias de DMO entre aa y AA fueron: 0.12 gr/cm² en trocánter ($p < 0.01$), 0.08 y 0.1 gr/cm² en cuello y triángulo de Wards ($p < 0.1$) por ANOVA. En concordancia, los coeficientes de correlación entre DMO y alelos variaron de 0.29 a 0.36 (todas $p < 0.05$). Por regresión múltiple, la DMO en los tres sitios del fémur se encontró en relación independiente y directa con los alelos "a" y en relación negativa con edad, antecedente de fractura y meses previos de lactancia (r_m de 0.56 a 0.67, $p < 0.0001$). En columna, la r_m fue de 0.52 ($p < 0.001$); nuevamente, los alelos se encontraron relacionados positivamente después de ajustarse para menopausia y la interacción de antecedente de fracturas con meses previos de lactancia ($p < 0.05$). Los datos muestran una asociación entre los alelos del gen RVD discernibles con *Apa I* y la DMO en el grupo estudiado. Estos resultados son similares a los de Morrison y cols. en población australiana, pero con diferencias menos marcadas de DMO entre los genotipos. Un estudio poblacional en este campo complementaría los hallazgos.

FIRMA DEL ASESOR



CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Dinamismo del Sistema Esquelético

El sistema esquelético está constituido por dos tipos de tejidos óseos: uno compacto y denso (*cortical*) que predomina en los huesos tubulares, y el otro que se observa como un entrelazamiento de espículas óseas que asemejan a la estructura de una esponja (*trabecular*) es el componente principal del esqueleto axial.

A diferencia de lo que se creía antiguamente, ahora se sabe que el sistema esquelético es altamente dinámico. Este dinamismo, proporcionado por una constante remodelación ósea, es necesario para cumplir con las funciones principales de este sistema: proporcionar soporte y mantener el equilibrio mineral. En el proceso de remodelación ósea, la formación y reabsorción son procesos acoplados de igual magnitud y de signo opuesto (1). Este equilibrio es proporcionado por los dos tipos principales de células que constituyen el hueso: los osteoblastos que sintetizan matriz ósea (parte no celular formada de fibras de colágena e hidroxiapatita) y los osteoclastos que la desmineralizan y digieren.

La mayor parte de las enfermedades óseas son el resultado de alteraciones de este equilibrio, ya sea como consecuencia primaria o secundaria de un trastorno hormonal, que produce formación o reabsorción excesivas.

1.2 Importancia de la Osteoporosis Como Problema de Salud Pública

Sin duda, la enfermedad ósea de tipo primario más importante por su alta frecuencia es la osteoporosis, la cual a su vez puede clasificarse como posmenopáusica y senil. Se define a esta enfermedad como la reducción acelerada de la masa ósea que da lugar al aumento en la susceptibilidad a sufrir fracturas ante un trauma mínimo (2).

En los E.U.A., 1.3 millones de fracturas por año son atribuidas a la osteoporosis, además de que se ha reportado que del 15 al 20 % de las mujeres mayores de 69 años muestran evidencia clínica de esta enfermedad. El riesgo de por vida de una mujer de tener fractura de cadera es del 17 %, el mismo de tener cáncer de mama, cervix, utero y ovario juntos. El 27 % de las mujeres que sufren fractura de cadera mueren en el primer año posterior al traumatismo y la mitad de las que sobreviven quedan incapacitadas de llevar una vida normal. El costo anual generado por fracturas relacionadas a la osteoporosis en los E.U.A. es de 8 a 13 mil millones de dólares (3).

1.3 Causas de la Osteoporosis

Es posible que la osteoporosis represente un punto final común a múltiples vías patogénicas y seguramente varias de éstas deban actuar conjuntamente para producir enfermedad clínica significativa.

El pico de densidad mineral ósea (DMO), que se alcanza al final de la tercera o principios de la cuarta décadas de la vida y la velocidad de pérdida de la misma, están determinados por factores genéticos y ambientales (4).

1.4 Efecto del Ambiente en los Orígenes de la Osteoporosis

Muchos han sido los factores ambientales que se han investigado en busca de una asociación directa con la osteoporosis. Los que sobresalen son los siguientes:

Calcio.- la ingesta de calcio es crucial durante el crecimiento para alcanzar niveles adecuados del pico de DMO. Sin embargo, el valor terapéutico de los suplementos con este mineral es aún controversial (5).

Vitamina D.- El efecto neto de la vitamina D o calcitriol a nivel de hueso e intestino consiste en aumentar el calcio sanguíneo disponible, lo que a su vez facilita la mineralización de la matriz ósea neoformada. Por otra parte, es un hecho conocido que el calcitriol se produce, después de varios pasos, a partir del 7-deshidrocolesterol de la piel. El primer paso en este proceso es catalizado por la radiación ultravioleta del sol (6). Se ha visto que las personas de raza negra tienen concentraciones menores en suero de calcitriol en comparación a las personas de raza blanca. El mecanismo que se propone es que la presencia del cromóforo melanina en altas concentraciones en la piel podría limitar la síntesis de vitamina D al competir con el 7-deshidrocolesterol por los fotones ultravioleta (7). A pesar de esto, las personas negras tienen DMO más alta que las blancas, lo que nos habla que intervienen otros factores para alcanzar esta característica, como la herencia.

Alcohol, cafeína y tabaquismo.- Los estudios en los que se investiga la relación de estos tres factores con la DMO arrojan resultados francamente controversiales, encontrándose a veces una asociación negativa entre ellos y a veces ninguna relación (8). Esto muy probablemente se debe a que en ocasiones no se utilizan métodos confiables o estandarizados para medir la concentración de alcohol, cafeína y tabaco en el organismo.

Actividad física.- La mayoría de los trabajos de investigación establecen una asociación positiva entre la actividad física y la DMO (9,10). Sin embargo, existen estudios en los que no se cumple este patrón, debido tal vez a que utilizan métodos subjetivos o poco confiables para medir la actividad física, como son cuestionarios mal elaborados, o aparatos que son molestos o influyen en el nivel habitual de ejercicio que una persona podría realizar (8,9).

Masa corporal.- Se ha observado que las mujeres que tienen un ligero sobrepeso o franca obesidad presentan cierta protección a la pérdida ósea después de la menopausia. Para este hecho se han postulado principalmente dos mecanismos de acción: la generación de las hormonas foliculo estimulante y luteinizante (las cuales proveen un efecto protector contra la desmineralización ósea) a partir del tejido adiposo en exceso (2) y la influencia del peso en las propiedades piezoeléctricas (presión-electricidad) de los huesos, las cuales le permiten remodelarse en respuesta a estímulos mecánicos. Este fenómeno produce una fuerza adicional del hueso cuando las exigencias estructurales son grandes (11).

Sexo.- Definitivamente las mujeres tienen DMO más baja. Esto se pone de evidencia al considerar que la incidencia de fracturas osteoporóticas es de dos a tres veces menor en el sexo masculino que en el femenino (2). Esta diferencia ha sido atribuida al factor hormonal, ya que en las mujeres se observa un declinamiento acelerado de la masa ósea en los años posmenopausia.

Edad.- El pico máximo de masa ósea se alcanza alrededor del final de la tercera y el principio de la cuarta décadas de la vida (4). A partir de este punto, empieza un declinamiento (que es más notable en las mujeres por el hecho anteriormente expuesto) que puede dar lugar a fracturas de tipo osteoporótico en los últimos años de vida del individuo. Se ha reportado que se pierde aproximadamente 0.1% de DMO por año (1-4). La edad conlleva por sí misma a una mayor exposición a todos los factores de riesgo conforme el tiempo pasa.

Factores hormonales.- Se ha llegado a considerar que el decaimiento en la producción de estrógenos que se produce a partir de la menopausia es el hecho que más impacto tiene en el decaimiento concomitante de la DMO (12). Además, se afirma que es en los primeros años posmenopáusicos en donde se pierde la mayor cantidad del contenido mineral del hueso, llegándose a perder en algunos casos hasta el 25 % del calcio total en los primeros 5 años de este estadio; aunque hay algunos estudios que no concuerdan en este hallazgo (13). A pesar de que la terapia a base de estrógenos ha sido utilizada comunmente en el tratamiento de la osteoporosis, ésta involucra un incremento en la incidencia de cáncer uterino (14) y de mama (15), además de que a veces no se encuentran resultados satisfactorios y no existe un acuerdo total en cuanto a la dosis y el tiempo de administración (16). Esto nos habla de la necesidad de encontrar un método adecuado de prevención más que de curación de la osteoporosis.

Antecedentes reproductivos.- En algunos estudios se ha encontrado relación entre la DMO y el número de embarazos y el tiempo de lactancia, de tal manera que en ocasiones el aumento de estas dos variables se ha asociado con DMO baja (17) y en otras con DMO alta (18). Tal vez la discrepancia entre estos resultados refleje diferencia en factores tales como nutrición y estilo de vida entre las poblaciones analizadas.

1.5 La Influencia Genética en la Densidad Mineral Ósea

Entre la enorme cantidad de estudios en los que se ha investigado los diferentes elementos que influyen en la conformación de la DMO, existen datos que indican que el componente genético es el principal determinante de la misma.

Por ejemplo, se han evaluado las diferencias intrapar en la DMO entre gemelos monocigóticos y dicigóticos. Estos estudios parten de la premisa de que los gemelos monocigóticos son idénticos genéticamente y los dicigóticos comparten solo una determinada cantidad de sus genes (aproximadamente el 50%). Así, una característica fenotípica que es determinada primariamente por influencias genéticas resulta en diferencias intrapar que son más pequeñas para los gemelos monocigóticos que para los dicigóticos. En cambio, una característica fenotípica que es determinada principalmente por influencias del medio ambiente, se espera que resulte en diferencias intrapar que son aproximadamente iguales para ambos tipos de gemelos. Christian y cols. realizaron un estudio longitudinal por un periodo de 16 años, en el que se comparó el peso del componente genético y el del factor ambiental en la determinación de la DMO en 42 pares de gemelos monocigóticos y 38 pares de gemelos dicigóticos. Estos investigadores encontraron que solo a edad muy avanzada, el componente ambiental (por ejemplo la dieta) supera la influencia del genético (19). Kelly y cols. realizando un estudio similar, concluyeron que aproximadamente el 80 % de la varianza en la DMO en la espina lumbar y el cuello del fémur es atribuible a factores genéticos (20).

Otros datos también respaldan la gran importancia del genoma de un individuo en la determinación de su DMO, tal y como es el caso de la historia familiar. Seeman y cols. evaluaron la DMO en hijas de mujeres osteoporóticas y en hijas de mujeres normales. Aunque estos individuos eran estadísticamente equivalentes en factores tales como edad, peso, altura y años posmenopausia, se encontró una diferencia significativa en sus valores de DMO, presentando las hijas de mujeres osteoporóticas hasta 7% menos de dichos valores en determinadas áreas corporales (21).

1.6 Alelos del gen del Receptor de la Vitamina D y Niveles de Osteocalcina

En 1992, Morrison y cols. estudiaron la relación entre tres polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's por sus siglas en inglés) del gen del receptor de la vitamina D (RVD) y los niveles séricos de osteocalcina en una población abierta en Australia. La osteocalcina es la proteína no-colágena más abundante del hueso, es producida exclusivamente por los osteoblastos y se une fuertemente a hueso mineralizado, pero una pequeña proporción de la osteocalcina recién sintetizada escapa a la circulación, donde es usada como un indicador clínico de recambio óseo. Niveles altos de osteocalcina en suero son indicadores de hueso deficientemente mineralizado.

Los RFLP's analizados en este estudio correspondían a las enzimas *Apa I*, *Bsm I* y *Eco RV* y fueron evidenciados por ensayos de "Southern Blot". Se encontró que determinados alelos del gen del RVD se asociaban con niveles bajos y otros con niveles altos de osteocalcina en suero. Estos resultados se mantenían cuando sólo se consideraban los datos obtenidos con las mujeres (eliminando de esta manera la variabilidad del factor sexo) y se observó que no había una diferencia significativa en los niveles de osteocalcina en suero entre las mujeres pre y posmenopáusicas cuando el análisis se limitaba a un solo polimorfismo (el genotipo fue más importante en la determinación de la densidad ósea que el estatus menopausal) (22).

1.7 Alelos del gen del Receptor de la Vitamina D y Densidad Mineral Osea.

En 1994, Morrison y cols. ampliaron sus estudios al analizar la relación entre el RFLP correspondiente a la enzima *Bsm I* y la DMO en pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos, y en una población de

mujeres sanas. En el primer caso, se observó de nuevo una menor diferencia intrapar en las DMO de los gemelos monocigóticos, lo que indica, como ya se mencionó, la fuerte influencia del factor genético en esta característica fenotípica analizada. Con las mujeres sanas se observó, mediante análisis de regresión múltiple, que el genotipo tenía mayor influencia en la determinación de la DMO, que factores tales como la edad, la altura, el peso y los años posmenopausia (23).

Los dos estudios descritos anteriormente fueron recibidos con mucho entusiasmo, pues ofrecían la posibilidad de predecir oportunamente la DMO esperada para la edad madura de la vida y por lo tanto inferir la probabilidad de sufrir fracturas osteoporóticas. Ni en México ni en el resto de Latinoamérica se han hecho estudios en los que se investigue la influencia del factor genético en la DMO. Considerando esto y la probabilidad de encontrar un método diagnóstico predictivo de osteoporosis en nuestra población, el propósito de este proyecto fue poner a prueba la siguiente hipótesis.

CAPITULO 2

HIPOTESIS

Algunos alelos del gen del receptor de la vitamina D se asocian a la densidad mineral osea en mujeres mexicanas

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

Para poner a prueba tal hipótesis, se diseñó y ejecutó la siguiente estrategia experimental (Fig. 1):

- 1.- Obtención del DNA genómico a partir de sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA.
- 2.- Amplificación de dos regiones hacia el final del gen RVD (una de 825pb y otra de 740pb), mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (referida como PCR por sus siglas en inglés).
- 3.- Detección de los RFLP's en los productos amplificados mediante digestión con las enzimas de restricción en cuestión (el de 825pb con la enzima *Bsm I* y el de 740pb con las enzimas *Apa I* y *Taq I*).
- 4.- Visualización del patrón alélico mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos digeridos.
- 5.- Determinación de la relación entre la tipificación alélica y la densidad mineral ósea del individuo.

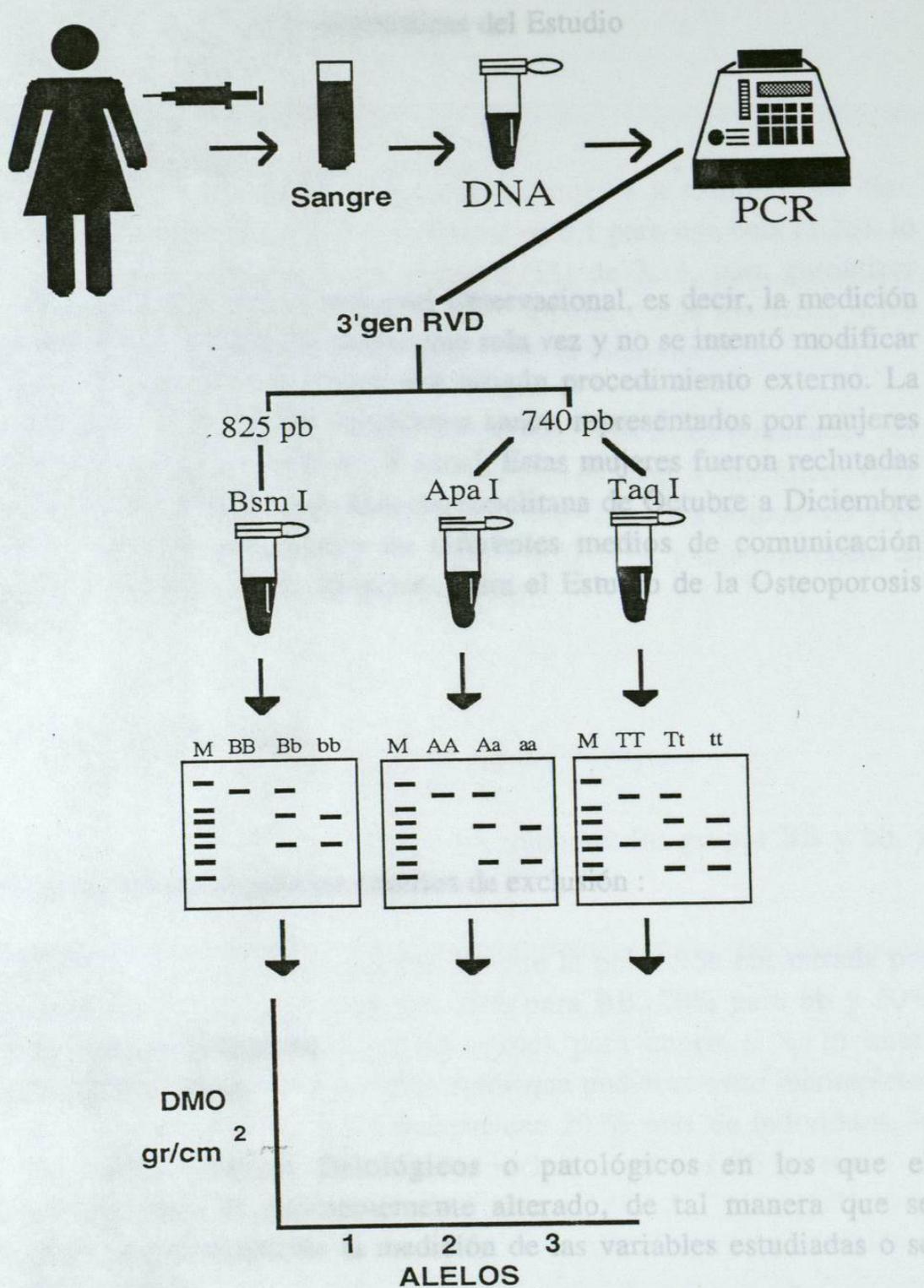


Figura 1. Estrategia General. Se Ilustran los Pasos a Seguir Para Establecer la Posible Relación Existente Entre Alelos del gen RVD y la Densidad Mineral Osea.

3.1 Características del Estudio

3.1.1 Sujetos Incluidos

Se siguió un diseño transversal-observacional, es decir, la medición de las variables a estudiar se realizó una sola vez y no se intentó modificar el valor de alguna de ellas mediante ningún procedimiento externo. La muestra consistió de sujetos voluntarios sanos, representados por mujeres adultas mexicanas (mayores de 25 años). Estas mujeres fueron reclutadas de la Ciudad de México y su área metropolitana de Octubre a Diciembre de 1994 a través de anuncios en diferentes medios de comunicación promovidos por el Comité Mexicano para el Estudio de la Osteoporosis (COMOP).

3.1.2 Criterios de Exclusión

Se establecieron los siguientes criterios de exclusión :

1. Embarazo
2. Lactancia
3. Enfermedades terminales
4. Deformidades óseas

Es decir, estados fisiológicos o patológicos en los que el metabolismo esté lo suficientemente alterado, de tal manera que se modifique importantemente la medición de las variables estudiadas o se dificulte la misma.

3.1.3 Tamaño de Muestra

El cálculo del número necesario de sujetos a estudiar, se hizo fijando α en 0.05 para dos colas (1.96) y β en 0.1 para una cola (1.28), lo que reditúa en un índice de probabilidad (PI) de 3.24, para garantizar encontrar una diferencia real entre las densidades óseas asociadas a los genotipos BB, Bb y bb del gen del receptor de la vitamina D.

En la estimación se utilizó como referencia los datos publicados por Morrison y cols. de un estudio similar realizado en sujetos caucásicos (23). Ellos encontraron una diferencia de 0.17 gr/cm² entre los grupos BB y bb con una desviación estandar común (DEC) de 0.0879, y una diferencia de 0.1 gr/cm² entre BB y Bb con la misma DEC.

Utilizando la siguiente fórmula :

$$n = 2 (PI \times DEC / X1 - X2)^2 \quad (24)$$

se encontró un valor de $n=6$ para poder comparar los grupos BB y bb, y un valor de $n=16$ para el mismo fin entre BB y Bb.

Como la distribución genotípica entre la población encontrada por dichos autores es aproximadamente 22% para BB, 28% para bb y 50% para Bb, era necesario reclutar 80 sujetos para cubrir el $n=16$ antes mencionado. Considerando aquellos datos que pudieran estar incompletos y algunos otros factores, debía muestrearse 20 % más de individuos, lo que en números redondos significaba incluir al menos 96 personas en nuestro estudio.

3.1.4 Determinaciones

A cada individuo incluido en el estudio se le practicaron las siguientes determinaciones :

Variantes alélicas del gen RVD discernibles con las endonucleasas de restricción *Bsm* I, *Apa* I y *Taq* I mediante la técnica PCR-RFLP's.

Densitometría ósea de rayos X de doble haz y baja energía (DEXA 1000) de las siguientes localizaciones corporales :

Fémur.- Cuello, Triángulo de Ward y Región Trocantérica.

Columna.- Vertebrae Lumbares (L2-L4).

Los factores no genéticos que han sido asociados a la patogenia de osteoporosis se evaluaron mediante un cuestionario autoadministrado.

3.2 Determinación de Polimorfismos en el gen RVD

3.2.1 Extracción de DNA

En este proyecto se utilizaron tres métodos distintos para la extracción de DNA, se eligió el que se consideró más adecuado para cada muestra en particular.

El método de Fenol-Sevag (25) era el que se venía utilizando rutinariamente en nuestro laboratorio, nosotros lo aplicamos para aquellas muestras de sangre que presentaban las mejores condiciones, es decir, que fueran frescas (un día o menos de haber sido extraídas) y tuvieran un volumen apropiado (tres ml o más). Por razones hasta ahora desconocidas, las muestras que no cumplían con estos dos requisitos y eran sometidas a

este método de extracción, resultaban en cantidades y calidades de DNA muy bajas.

El método de Desalado (Salting-Out) (26) ha sido referido como fácil, rápido, económico y sin riesgo alguno, pues no utiliza solventes orgánicos para desnaturalizar y extraer las proteínas. Este método se aplicó y funcionó aceptablemente en muestras con un volumen de sangre intermedio (de 1 a 3 ml) y hasta tres o cuatro días de antigüedad.

El método de TSNT (27) se utilizó en muestras que contenían menos de 1 ml, ya que el mismo permite extraer DNA a partir de volúmenes tan pequeños como 300 μ l de sangre.

Una vez extraído el DNA, su integridad por un lado, y su pureza y concentración por el otro, se determinaron por electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV), respectivamente.

3.2.1.1 Fenol-Sevag.

La muestra de sangre, anticoagulada con EDTA 5 mM, se colocó en un tubo de polipropileno de 50 ml, se agregaron 20 ml de buffer de lisis (NH_4Cl a 155 mM, NaHCO_3 a 10 mM, EDTA a 0.1 mM, pH 7.4), se colocó en hielo durante 15 min, mezclando ocasionalmente de manera suave y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 400 g y 4°C.

Se descartó el sobrenadante, obteniéndose la pastilla de leucocitos, la cual para lavarla y optimar la lisis de los eritrocitos, se resuspendió en 10 ml de buffer de lisis, se incubó por 5 min en hielo y nuevamente se centrifugó a las condiciones descritas en el paso anterior; éste último paso se repitió una vez más con 5 ml de buffer de lisis.

La pastilla de leucocitos desprovista de eritrocitos se resuspendió en 6 ml de TE (Tris-HCl a 10mM, EDTA a 1 mM, pH 8), se agregaron 60 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 300 μ l de sarcosil al 20% (Sarcosinato N-laurílico). Se mezcló bien y se incubó a 50°C durante 12 ó 14 horas.

La muestra se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml, se agregó medio volumen de fenol saturado (3 ml), y se mezcló suave pero completamente por inversión durante 5 min. Posteriormente, se añadió medio volumen de Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), se mezcló en una plataforma agitadora vertical por 20 min y se centrifugó a 3000 g y 4°C durante 15 min. Con una puntilla de 1 ml, la cual fue desprovista de la punta para generarle una boca ancha (para minimizar el rompimiento del DNA por fricción), se recuperó la fase acuosa procurando evitar la interfase. Se repitió el paso anterior y finalmente se realizó una nueva extracción con 1 volumen (6 ml) de Sevag.

La fase acuosa final se transfirió a un tubo de 50 ml, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol al 100 % y se mezcló suavemente por inversión. El DNA se extrajo enredándolo en una pipeta Pasteur, cuya punta había sido previamente doblada a manera de gancho. Las fibras del DNA obtenido se lavaron con etanol al 70%, se dejaron secar ligeramente y se agitaron y desprendieron en 1 ml de TE en un tubo de microcentrífuga. Para asegurar que el DNA se resuspendiera homogéneamente, se mezcló durante 12 ó 14 horas en una plataforma agitadora vertical. Posteriormente se procedió a determinar su concentración y calidad.

3.2.1.2 TSNT.

Se colocaron 300 µl de sangre total anticoagulada con EDTA 5mM en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadieron 200 µl de buffer de lisis (Tritón 100X al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 1 mM, pH 8) y 500 µl de fenol saturado. Se mezcló completamente por inversión durante un min.

Posteriormente, se agregaron 100 µl de Sevag y se agitó en Vortex durante 5 min. Una vez concluida la agitación, se añadió a la mezcla 200 µl de TE y se procedió inmediatamente a centrifugar por 20 min a 14,000 g y 4°C. Una vez concluida la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a

un tubo de microcentrífuga de 2 ml y se precipitó el DNA agregando 1 ml de etanol al 100%.

Por último, se centrifugó por 2 min a 14,000 g y 4°C para decantar el sobrenadante y se resuspendió el DNA en 400 µl de TE mediante agitación durante 12 ó 14 horas en una plataforma vertical, para posteriormente determinar su concentración y calidad.

3.2.1.3 Desalado (Salting-out).

El botón de células blancas se obtuvo por el mismo procedimiento descrito para el método de Fenol-Sevag. Inmediatamente se resuspendió el mismo en 3 ml de buffer de lisis para leucocitos (Tris-HCl a 10 mM, NaCl a 400 mM y EDTA a 2mM, pH 8.2) y se agregaron 60 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y 200 µl de SDS (lauril sulfato de sodio) al 10%.

Se incubó durante 48 horas a 50°C para posteriormente transferir todo el contenido a un tubo de 15 ml y añadir 1 ml de NaCl saturado (6M). Se agitó vigorosamente aproximadamente 20 segundos y se centrifugó 15 min a 2100 g y 4°C.

Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 15 ml y se centrifugó a las condiciones descritas anteriormente. Una vez concluida la centrifugación, se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 15 ml y se precipitó el DNA agregando 2 volúmenes de etanol.

Se recuperó el DNA con una puntilla y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se resuspendió con 1 ml de TE mediante agitación durante 12 ó 14 horas, para luego determinar su concentración y calidad.

3.2.1.4 Espectrofotometría.

La concentración de DNA se determinó por la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación UV absorbida por las bases a 260 nm.

Se colocó 1 ml de TE en una celda de cuarzo para UV, se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbancia y se añadió 1 μ l de la muestra, se mezcló bien por inversión y se tomaron lecturas a 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se determinó utilizando la siguiente fórmula:

Conc.de DNA ng/ μ l= (50) (factor de dilución) (lectura a 260 nm)

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volumen total después de la dilución}}{\text{volumen tomado de la muestra}}$$

Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50 μ g/ml de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se obtuvo mediante la relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}), la cual nos da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Una preparación de alta pureza de DNA tiene una relación DO_{260}/DO_{280} entre 1.8 y 2.0. Al haber contaminación con proteínas o fenol, esta relación puede disminuir e incluso la cuantificación no es muy precisa.

3.2.1.5 Electroforesis en gel de Agarosa.

La estimación de la cantidad de DNA en la muestra de interés, se llevó a cabo sometiendo el mismo a un campo electroforético utilizando la fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas entre sus bases e inducida por la radiación UV, comparándola con la fluorescencia de una serie de estándares. Asimismo, se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético, evidenciando la degradación la presencia de un barrido, el cual inicia en la porción inferior de la banda del DNA y se proyecta hacia la parte baja del gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-Borato al 0.089 M, ácido bórico al 0.089 M), el cual una vez polimerizado se depositó en una cámara de electroforesis y se cubrió con buffer. Se mezcló 1 μ l de la muestra a cuantificar con 1 μ l de jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, Xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%). De la misma manera, se preparó una serie de estándares cambiando el DNA a cuantificar por cantidades conocidas y variables de las muestras estándares. La serie de preparaciones se colocaron en los carriles del gel y se realizó electroforesis inicialmente a 60 V mientras se internaba el colorante en el gel y posteriormente a 100 V por 1 hora.

Concluída la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 μ g/ml por 5 ó 10 min y luego se lavó varias veces para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación en un transiluminador de luz UV. Se determinó la concentración del DNA por comparación visual con los estándares. La integridad se evaluó tomando en cuenta la intensidad del barrido, la cual determina el grado de degradación; la ausencia de tal barrido indica que el DNA extraído está íntegro.

3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Gracias a la técnica de la PCR es posible obtener millones de copias de un gen o segmento de DNA, del cual existe una o algunas copias dentro de los cientos de miles que constituyen el genoma humano. Esta ha planteado nuevas alternativas en el diagnóstico de una gran variedad de trastornos genéticos y ha propiciado que se abran nuevas avenidas en el campo de la investigación biomédica (28) (Fig. 2).

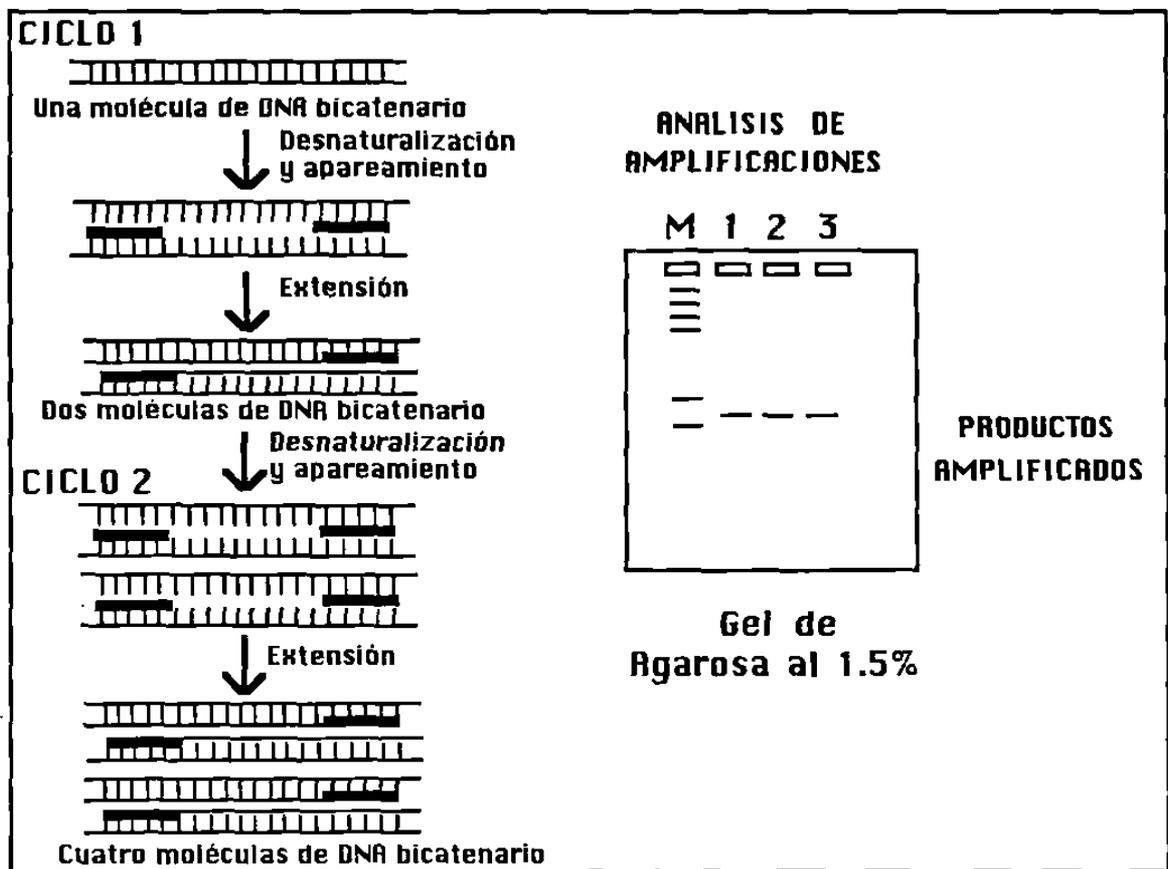


Figura 2. Esquema que Representa dos Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se Ilustran dos Ciclos de la PCR. En Cada Ciclo se Duplican las Cadenas de DNA Blanco Existentes al Inicio (Panel Izquierdo). Al Resolver el Producto de la Amplificación por Electroforesis en gel de Agarosa, se Observa una Banda Unica Correspondiente al Fragmento de DNA Amplificado Millones de Veces (Panel Derecho).

En este estudio se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos iniciadores (Tabla I) para amplificar secuencias de la región 3' no traducida del gen RVD. Las secuencias de dichos iniciadores nos fue proporcionada mediante comunicación personal por el Dr. Nigel Morrison del Garvan Institute of Medical Research de Sydney, Australia.

TABLA I

SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES
PARA LA REGION 3' DEL GEN RVD

PARA EL PRODUCTO AMPLIFICADO DE 825 pb:

5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (360-9)
5'-AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG-3' (360-10)

PARA EL PRODUCTO AMPLIFICADO DE 740 pb:

5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' (950302-12)
5'-GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA-3' (950302-13)

Para la detección del RFLP correspondiente a *Bsm* I se amplificó una región de 825 pb, utilizando las siguientes condiciones de reacción :

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ l)
H ₂ O ultrapura	----	12
Buffer PCR 10X	1X	2.5
iniciador 360-9 5 μ M	0.2 μ M	1
iniciador 360-10 5 μ M	0.2 μ M	1
dNTP's 10 mM	0.2 mM	0.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM	2.5
Taq polimerasa 5 U/ μ l	----	0.5

El volumen total de reacción fue 25 μ l y se añadió el volumen necesario de DNA blanco para alcanzar 200 ng totales.

y el siguiente programa en el termociclador :

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo(min)	Evento
1	94	4	Desnaturalización prol
2	94	1	Desnaturalización
3	62	1	Apareamiento
4	72	1	Extensión
5		30 ciclos al paso 2	
6	72	5	Extensión prol.

Para la detección de los RFLP's correspondientes a *Apa I* y *Taq I* se amplificó una región de 740 pb utilizando las siguientes condiciones de reacción :

Reactivo	Concentración final	Volumen (µl)
H ₂ O ultrapura	----	13
Buffer PCR 10X	1X	2.5
iniciador 950302-12 5µM	0.2 µM	1
iniciador 950302-13 5µM	0.2 µM	1
dNTP's 10 mM	0.2 mM	0.5
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM	1.5
Taq polimerasa 5 U/µl	----	0.5

El volumen total de reacción fue 25 µl y se añadió el volumen necesario de DNA blanco para alcanzar 200 ng totales.

y el siguiente programa en el termociclador :

Paso	Temperatura(°C)	Tiempo(min)	Evento
1	94	4	Desnaturalización prol
2	94	1	Desnaturalización
3	64	1	Apareamiento
4	72	1	Extensión
5		30 ciclos al paso 2	
6	72	5	Extensión prol.

El resultado de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.2.3 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

El estudio de los RFLP's parte del siguiente fundamento (29) (Fig. 3): existen enzimas, llamadas endonucleasas de restricción, que cuando reconocen secuencias nucleotídicas específicas (sitio de restricción) en ciertas regiones génicas, rompen la doble hélice del DNA produciendo bandas que pueden visualizarse mediante electroforesis en gel, correspondiendo la suma de sus tamaños a la longitud de la secuencia original (individuo del extremo izquierdo en la figura 3).

Entre diferentes individuos, es normal encontrar variaciones nucleotídicas que no tienen consecuencia patológica, para cualquier región génica. En ocasiones, tales variaciones hacen que se pierdan sitios de restricción que portan la región génica en cuestión en ambos alelos del par de cromosomas homólogos, visualizándose en este estudio una sola banda (secuencia no digerida, individuo del extremo derecho en la figura 3).

Aún más, existen individuos que presentan el sitio de restricción intacto en solo uno de sus dos alelos, evidenciándose en la electroforesis un patrón de bandas que será la combinación de los dos descritos anteriormente (una banda no digerida y la otra cortada en dos; ver la representación del individuo del centro en la figura 3).

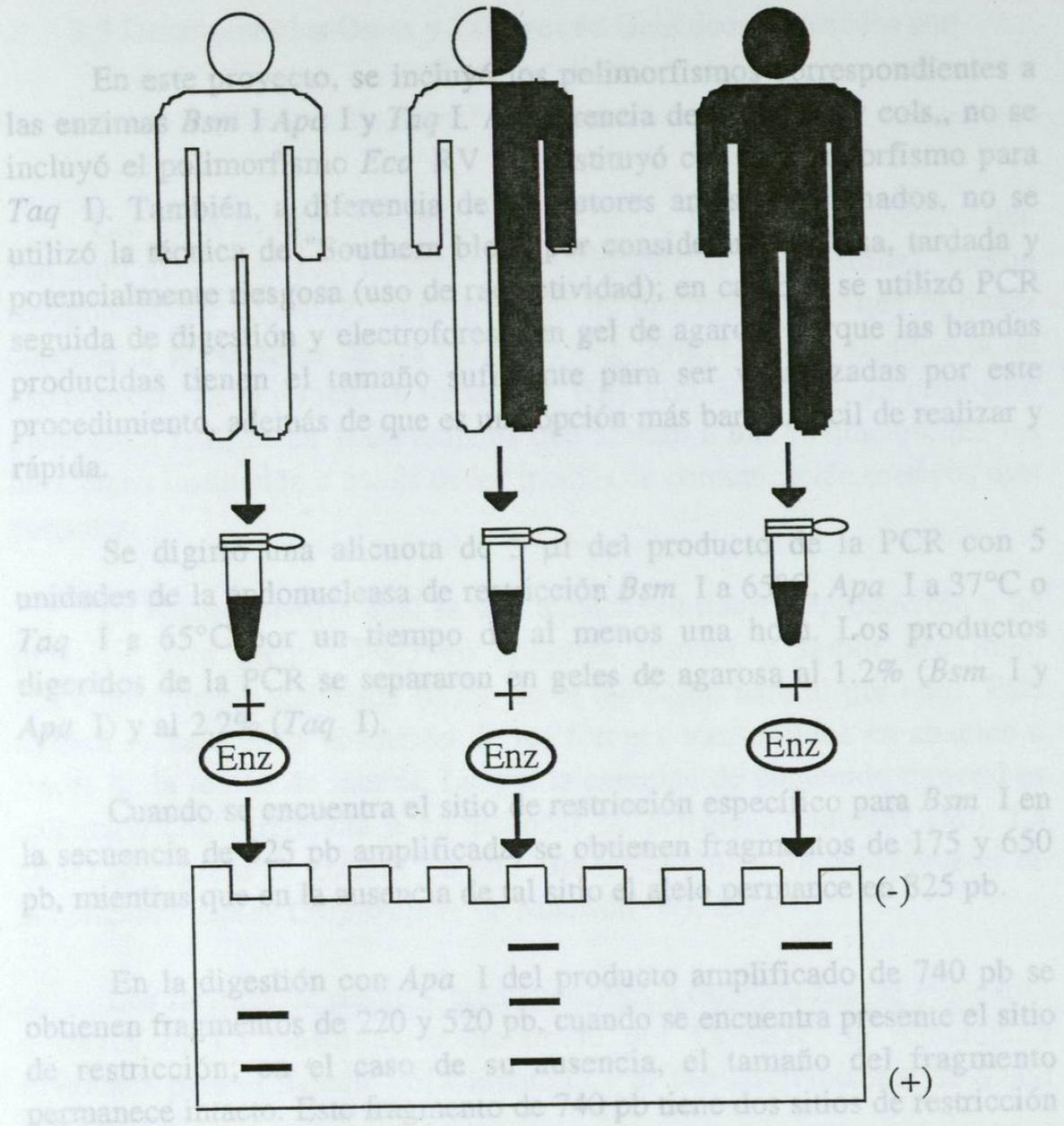


Figura 3. Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP's). Se Observa el Patrón de Bandas Presentado por Individuos Homocigóticos (Izquierda) Para la Presencia del Sitio de Corte Polimórfico de una Enzima de Restricción (Enz) Dada, Heterocigóticos (Centro) Para Dicho Sitio Polimórfico y Homocigóticos (Derecha) Para la Ausencia del Mismo.

En este proyecto, se incluyó los polimorfismos correspondientes a las enzimas *Bsm* I *Apa* I y *Taq* I. A diferencia de Morrison y cols., no se incluyó el polimorfismo *Eco* RV (se sustituyó con el polimorfismo para *Taq* I). También, a diferencia de los autores antes mencionados, no se utilizó la técnica de "Southern blot", por considerarla costosa, tardada y potencialmente riesgosa (uso de radiactividad); en cambio, se utilizó PCR seguida de digestión y electroforesis en gel de agarosa porque las bandas producidas tienen el tamaño suficiente para ser visualizadas por este procedimiento, además de que es una opción más barata, fácil de realizar y rápida.

Se digirió una alícuota de 5 μ l del producto de la PCR con 5 unidades de la endonucleasa de restricción *Bsm* I a 65°C, *Apa* I a 37°C o *Taq* I a 65°C por un tiempo de al menos una hora. Los productos digeridos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2% (*Bsm* I y *Apa* I) y al 2.2% (*Taq* I).

Cuando se encuentra el sitio de restricción específico para *Bsm* I en la secuencia de 825 pb amplificada, se obtienen fragmentos de 175 y 650 pb, mientras que en la ausencia de tal sitio el alelo permanece en 825 pb.

En la digestión con *Apa* I del producto amplificado de 740 pb se obtienen fragmentos de 220 y 520 pb, cuando se encuentra presente el sitio de restricción; en el caso de su ausencia, el tamaño del fragmento permanece intacto. Este fragmento de 740 pb tiene dos sitios de restricción para *Taq* I, uno es polimórfico y el otro no. Un homocigoto para la ausencia del RFLP de *Taq* I presenta el siguiente patrón de bandas: 495 y 245 pb. En cambio, un homocigoto para la presencia del mismo presenta un patrón de bandas de 290, 245 y 205 pb. Finalmente, se reconoce un heterocigoto porque presenta un patrón de bandas que es la mezcla de los dos mencionados anteriormente: 495, 290, 245 y 205 pb.

3.3 Densitometrías Óseas y Factores no Genéticos Asociados con Osteoporosis

Los datos de densitometrías óseas y de los factores no genéticos que han sido asociados con osteoporosis utilizados en este estudio, fueron recopilados por COMOP, como parte de un programa en el que se busca conocer la prevalencia de las variantes que influyen en la incidencia de osteoporosis en la población mexicana. Para ello, se diseñó un protocolo planeado a realizar en 1000 mujeres que acudan a una invitación que les hace dicha institución a través de los medios de comunicación masivos más comunes.

La absorciometría dual es una técnica confiable, reproducible y no invasiva para medir DMO en columna lumbar y fémur proximal, prácticamente sin radiación (0.1% de la radiación natural por año). Esta técnica se basa en la absorción de los fotones transmitidos en abanico a través de la región de interés. Luego, la cantidad de contenido mineral es calculada con referencia a un estándar de densidad conocida (30). La DMO se expresa en gr/cm^2 . En este estudio se utilizó un densitómetro de la compañía *Lunar Corporation*, de Madison, WI, EUA.

Los factores de riesgo y predisponentes a osteoporosis, se evaluaron a través de un cuestionario elaborado por COMOP, la Asociación Mexicana para el Estudio del Climaterio y el Instituto Nacional de Salud Pública.

3.4. Métodos Estadísticos

Se evaluó la representatividad de nuestra muestra buscando el valor reportado para las variables de interés en la población en general, en los intervalos de confianza de la media o proporción, según la variable fuera continua o dicótoma. Se investigó la asociación entre los alelos del gen

RVD y la DMO por análisis de varianza (ANOVA) de un solo sentido y los coeficientes de correlación. La correlación fue utilizada también como uno de los métodos para descartar colinearidad al efectuar regresión múltiple. Las variables candidatas a influir sobre la DMO (variable dependiente), mismas que aparecen en la matriz de correlación, se seleccionaron mediante el método "stepwise" en la regresión múltiple, para de esta manera identificar la asociación independiente y evitar el efecto sobre el nivel de significancia al efectuar múltiples comparaciones bivariadas. Los residuales de la regresión múltiple fueron analizados para confirmar que la ecuación cumpliera con los requerimientos para efectuar esta prueba (31).

Todos los métodos estadísticos se llevaron a cabo con el paquete SPSS/PC en una computadora IBM PS/1.

3.5. Origen de los Reactivos y Materiales Utilizados

Para el aislamiento del DNA se utilizó EDTA, cloruro de amonio, bicarbonato de sodio, trizma base, proteínasa K, sarcosinato N-laurílico, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, tritón 100X, SDS, NaCl y etanol adquiridos todos en Sigma Chemical Company (Saint Louis Missouri, EUA) y en JT Backer (San Antonio, TX, EUA). Fueron utilizadas las centrífugas clínicas Beckman modelo TJ-6R (Fullerton, CA, EUA) y Centra MP4R de IEC (Needham Heights, MA, EUA). La cuantificación y el análisis de la calidad de los DNA's fueron valorados en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-50, cámaras de electroforesis horizontales Fotodyne (Hartland, WI, EUA) y una fuente de poder BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, EUA).

La PCR se realizó con iniciadores sintetizados por la compañía Biosynthesis (Lewisville, TX, EUA) y por nuestro laboratorio de Química Biomolecular. La DNA polimerasa Taq fue adquirida de Promega (Madison, WI, EUA). Se utilizó un termociclador automatizado modelo PT-150 de la compañía MJ Research (Watertown, MA, EUA) y una

campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MI, EUA). El aceite mineral estéril fue comprado a Sigma Chemical Company.

Para analizar los productos de la PCR se utilizó una cámara horizontal Fotodyne y una fuente de poder BRL modelo 250; ácido bórico, agarosa y colorantes xilencianol y azul de bromofenol comprados a Sigma Chemical Company.

Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas a Gibco BRL (*Bsm I* y *Apa I*) y a New England Biolabs (*Taq I*). El equipo y reactivos utilizados para la electroforesis en este punto son los mismos que se usaron para analizar los productos de la PCR.

Los tubos de microcentrífuga de 0.5, 1.0 y 1.5 ml y las puntillas de 0.2 y 1.0 ml fueron comprados a Cel Associates (Houston, TX, EUA) y las pipetas de precisión de 2, 10, 20 y 1000 μ l a Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA).

Otros equipos utilizados fueron: microcentrífuga Eppendorf modelo 5402, placa agitadora con control de temperatura Corning modelo PC320 (NY, EUA), ultracongelador So-Low de Enviromental Equipment (Cincinnati, OH, EUA), báscula digital Sartorius 1206 MP (Camibh, Göttingen, Germany), evaporador y concentrador Labconco Corporation modelo 78100-00.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Respuesta a Participar en el Estudio

Durante el periodo de reclutamiento se presentaron 248 voluntarias (Tabla II). De 99 de ellas se obtuvieron datos sobre el cuestionario, la DMO y los polimorfismos RVD. Esta cifra llena el requisito del número de individuos que permite poner a prueba la hipótesis en estudio. De las otras 149 se obtuvieron datos incompletos, esto por motivos diversos; en la mayoría de los casos por una deserción voluntaria por cuestiones personales.

No se encontró diferencias significativas al comparar los datos procedentes de ambos subgrupos (datos completos vs incompletos), por lo que asumimos que no existe sesgo procedente de la respuesta parcial en un número grande de sujetos.

4.2 Características Generales del Grupo Estudiado

La edad promedio del grupo estudiado correspondió a la sexta década de la vida (Tabla III), en consecuencia, dos terceras partes estaba en etapa posmenopáusica; de ellas, el 45% reportó entrar en este estadio

después de algún procedimiento quirúrgico. Solo el 12% de las voluntarias reportó tener terapia de estrógenos de reemplazo.

Poco más de un tercio usó anticonceptivos hormonales en un promedio de tres años, es decir, en solo la décima parte del periodo de reproducción. El 88% reportó tener hijos, con un promedio de 4 y un periodo de lactancia medio de 19 meses.

El 47% respondió si a la pregunta ¿hace usted ejercicio? y aproximadamente un tercio de ellas presentaba sobrepeso u obesidad. El 36% reportó que fumaba o fumó alguna vez (casi la mitad de ese porcentaje era ex-fumadora) al menos 100 cigarrillos durante toda su vida. Catorce de las voluntarias reportó haber sufrido fracturas en los últimos 5 años.

4.3 Análisis del DNA

En la figura 4 se muestran tres ejemplos para cada uno de los dos productos amplificados obtenidos en este estudio (825 y 740 nucleótidos) y los tipos de variantes alélicas discernibles por las endonucleasas de restricción *Apa* I, *Bsm* I y *Taq* I. Por otro lado, las frecuencias alélicas del gen RVD encontradas en el grupo estudiado, se muestran en la tabla IV.

Bsm I y *Taq* I identificaron en la muestra la existencia de tan solo un 6% de individuos BB y un 2% de individuos tt, por lo que su escasa representatividad imposibilitó el contraste con sus respectivos homocigotos opuestos; en cambio, por *Apa* I resultó un 18% de individuos AA y un 26% de aa. En consecuencia, los análisis estadísticos bivariado y multivariado presentados posteriormente, se referirán al polimorfismo *Apa* I.

4.4 Densitometrías Oseas

El promedio y desviación estándar de las densidades óseas de las cuatro localizaciones corporales analizadas, se muestra en la Tabla V.

Los promedios de las DMO observadas oscilaron entre 0.76 gr/cm² en la región del trocánter femoral y 1.04 gr/cm² en las vértebras lumbares. La variación de DMO encontrada entre los sitios estudiados es similar a la reportada para este mismo método en otros grupos (3).

4.5 Análisis de Varianzas y de Correlación

El análisis de varianza (ANOVA) de un solo sentido, para la relación del polimorfismo *Apa* I con la DMO (tabla VI), muestra que las diferencias en las medias de DMO entre AA y aa fueron: 0.12 gr/cm² en trocánter ($p < 0.01$); 0.08 y 0.1 gr/cm² en cuello y triángulo de Ward, respectivamente ($p < 0.1$). En columna no se encontró diferencia significativa de DMO entre ambos homocigotos. Estos resultados se reflejan en los coeficientes de correlación (tabla VII), los cuales variaron de 0.29 a 0.36 (todas $p < 0.05$) entre la DMO de las tres regiones del fémur y el polimorfismo *Apa* I. En columna, el coeficiente no fue significativo. En este mismo análisis, se apreciaron asociaciones ya esperadas y obvias, como menopausia con edad y DMO. Asimismo, a mayor edad se presentaron DMO mas bajas. Las DMO de todos los sitios esqueléticos estuvieron asociados entre sí de una manera positiva, correlacionándose mejor los tres sitios del fémur proximal entre sí, que con la columna lumbar. Por otra parte, el tabaquismo presentó una relación positiva con el consumo de alcohol y con el uso de hormonas de sustitución. En nuestro grupo de estudio no se encontró una asociación significativa mediante este análisis entre la DMO y las siguientes variantes: uso de hormonas de sustitución, peso, número de hijos, lactancia, ingesta de alcohol y tabaquismo.

4.6 Análisis de Regresión Múltiple

Mediante el análisis de regresión múltiple (tabla VIII), considerando a la DMO como la variable dependiente y las variables que aparecen en la matriz de correlación como independientes, se encontró que para el fémur los coeficientes de determinación (r^2) variaron entre 31 y 45 entre las diferentes regiones; la edad fue la primer variable predictiva, seguida por el genotipo "aa" y antecedente de fracturas o meses previos de lactancia (rm de 0.56 a 0.67, $p < 0.0001$); el genotipo "aa" de una manera positiva y las otras tres negativa. Los cambios en el coeficiente de determinación (Δr^2) variaron de 9.9 a 3.8 para el factor genético ($p < 0.01$). En la columna, donde se observó un r^2 de 27.4 (menor que cualquiera de los tres del fémur) y un rm de 0.52 ($p < 0.001$), también el polimorfismo *Apa I* fue un predictor independiente y positivo, con un Δr^2 de 4.1 ($p < 0.05$), pero esta asociación fue evidente después de ajustar para la primer variable predictiva, menopausia y la interacción de meses de lactancia con antecedente de fracturas, ambas relacionadas inversamente a la DMO.

CAPITULO 5

DISCUSION

Este es el primer estudio realizado en mujeres Mexicanas voluntarias sanas en el que se evalúa la DMO y su relación con factores genéticos. Los resultados muestran que existe una asociación entre los alelos *Apa* I del gen RVD con la DMO, lo cual concuerda con otros estudios (23,32,33,34), aunque comparativamente las diferencias en DMO entre los genotipos fue menos pronunciada (23).

La muestra estudiada es representativa de las mujeres adultas que viven en la Ciudad de México, ya que sus características tales como peso, altura, paridad, etc. son muy semejantes a las reportadas por los departamentos de salud pública y por otros estudios poblacionales (35,36,37); únicamente la frecuencia de menopausia quirúrgica fue mayor a la esperada, sin embargo al comparar las mujeres que presentaban menopausia natural contra aquellas que presentaban menopausia quirúrgica en factores tales como DMO, frecuencias alélicas, uso de hormonas, etc., no se encontró diferencias significativas, descartándose de esta manera sesgo por tipo de menopausia. Las frecuencias de los alelos RVD, identificados por las endonucleasas de restricción *Apa* I, *Bsm* I y *Taq* I, no estuvieron tan cercanas entre sí como en las poblaciones caucásicas. Esta discrepancia se reflejó en la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (38), en la que los genotipos discernibles por *Apa* I y *Bsm* I estuvieron en equilibrio, pero no el correspondiente a *Taq* I ($df=2$, $X^2=6.6$, $p<0.05$). Este hecho podría sugerir un flujo genético en la población mexicana, la cual, como es conocido, desciende tanto de europeos (principalmente españoles) como de indios americanos. Entre

mas pequeña sea la proporción de un alelo (polimorfismo) nuevo, se requiere de un mayor número de generaciones para que se alcance el equilibrio (38). Es necesario un estudio poblacional para concluir la frecuencia de distribución de los genotipos. Uno de los dos homocigotos posibles determinados por las endonucleasas *Bsm I* y *Taq I*, estuvieron presentes en menos del 6% de los sujetos analizados, lo cual impidió la detección de alguna asociación con la DMO; por eso, todos los análisis presentados corresponden al polimorfismo identificado con *Apa I*. La media de la DMO en columna lumbar fue mayor y se presentó mayor variabilidad en las mediciones con respecto a cualquiera de los tres sitios proximales del fémur, tal y como ha sido reportado en otras poblaciones (3).

La asociación entre los alelos del gen RVD (*Apa I*) y la DMO, fue evidente mediante el análisis bivariado (ANOVA de un solo sentido) y los coeficientes de correlación en los tres puntos del fémur proximal, aunque no en la columna lumbar. La diferencia en las medias de la DMO entre los homocigotos en el fémur, variaron de la mitad a una desviación estándar. Debemos hacer notar que el número de nuestra muestra fue el necesario para determinar una asociación sin el efecto de otras variables que influyen la DMO (31). Así, cuando se utilizó el análisis de regresión múltiple para ajustar por la primer variable predictora, menopausia (si vs no) y la variable interactiva: el producto de meses de lactancia con historia de fracturas previas, el tercer predictor fueron los alelos RVD en la columna lumbar, los cuales mostraron una asociación positiva e independiente con la DMO. Esta asociación denota una diferencia de la mitad de una desviación estándar entre los homocigotos, la cual es menor a la encontrada en mujeres australianas (0.086 gr/cm² vs 0.17 gr/cm² respectivamente).

Es interesante hacer notar que las mujeres mexicanas tienen periodos de lactancia mas largos que sus contrapartes europeas, y que este factor no ha sido bien estudiado en poblaciones con alto índice de paridad y periodos largos de lactancia. Entre nuestras mujeres menopáusicas, 11 tuvieron antecedente previo de fracturas, de las cuales 10 habían lactado, y de éstas, 7 lo hicieron por más de 13 meses. Ya que el periodo promedio

de lactancia fue 19 meses, es evidente que hubo mujeres que lactaron por más de 13 meses y que aún sin antecedente previo de fracturas, presentaron menor DMO que aquellas que lactaron de 0 a 12 meses. El calcio dietético no fue medido en el grupo estudiado, por lo que no se puede descartar una ingesta baja de calcio en las mujeres que lactaron por periodos largos de tiempo.

La asociación de los alelos del gen RVD con la DMO en los tres sitios del fémur proximal, se observa de una manera indiscutible después de ajustar por edad; la diferencia entre los homocigotos en la DMO fue de una desviación estándar en todos los sitios estudiados del fémur. El tercer predictor fue, al igual que en la columna, la historia de fracturas o los periodos de lactancia, ambos en una forma negativa. A diferencia del estudio Australiano, el peso y la altura no fueron variables predictoras, debido probablemente al poder insuficiente de nuestra muestra para identificar diferencias mas pequeñas que las detectadas. ¿Por que en nuestro grupo de estudio fue mas fácil observar la asociación de los alelos con la DMO en el fémur proximal mientras que en Australia los mismos fueron mejores predictores en la columna lumbar?, pudo deberse a varios factores, como un mayor efecto de los artificios al hacer las mediciones de la DMO en columna (formas subclínicas: densidad incrementada en las estructuras que rodean las vértebras, desviaciones de la misma, etc.); también hay que considerar que algunos estudios han mostrado que el índice de descalcificación puede variar entre diferentes sitios (39) y que el patrón de descalcificación no ha sido estudiado en mexicanas. Por otra parte, la diferencia mas pequeña en DMO entre los homocigotos en este estudio, sugiere que la asociación identificada con el polimorfismo *Apa* I puede representar solo parte de las diferencias entre las variantes naturales del gen RVD ya que se encontró muy poca frecuencia de B y t y este último sin alcanzar el equilibrio todavía.

El mecanismo mediante el cual los alelos del gen RVD influyen la DMO todavía es desconocido. Los polimorfismos analizados se encuentran hacia la región 3' no traducida de dicho gen, cuyas propiedades intrínsecas en secuencia afectan la estabilidad del RNAm, ya sea a través de la presencia de copias múltiples del motivo AUUUA, el cual es altamente

sensitivo a las RNAasas (40), o a través de cambios en la longitud de la cola de poli(A) (41). Morrison y cols. han identificado múltiples variaciones en la secuencia de la región 3' no traducida entre los haplotipos BAt y baT (23). Estas diferencias todavía se están investigando. Actualmente, en nuestro laboratorio de Medicina Molecular, estamos investigando la asociación de los polimorfismos discernibles con *Pvu* II y *Xba* I en el gen del receptor de estrógenos con la DMO. En Australia, se encontró una asociación entre el primer polimorfismo mencionado y esta característica física.

Por otra parte, la no asociación encontrada en un estudio realizado en Indianapolis E.U.A. (42), es intrigante. Pero al considerar que en un estudio realizado en Suecia (43) no se encontró una significancia estadística para la asociación del gen RVD con la DMO y la Osteocalcina, nos hace pensar que los alelos RVD pudieron variar en alguna época para compensar un factor ambiental! (baja incidencia de luz solar) y proveer un genotipo resistente a raquitismo, el cual implica un ritmo mayor de recambio óseo. Este alelo podría promover formación ósea con niveles mas bajos de vitamina D; sin embargo, este mecanismo representaría una desventaja en la etapa madura de la vida, cuando la disponibilidad de osteoblastos baja por envejecimiento (44), dando lugar a que la sobreinducción del recambio óseo quede incompletamente compensado conduciendo a desmineralización. Suecia esta localizada a 60° latitud N, lo que podría provocar una asociación menos obvia que para una población con genotipo similar en una área con alta incidencia de luz solar, como lo son Sidney Australia y la Cd. de México (33°S,20°N latitud, respectivamente).

Es recomendado que incluso en estudios con orientación genética, los perfiles de otros factores candidatos, como calcio de la dieta, adipocidad, tabaquismo, etc. sean estudiados completamente. Indianapolis está localizada a 40° latitud N, pero el estudio realizado en dicha ciudad no provee información para estas variables, las cuales podrían oscurecer los efectos esperados para niveles intermedios de luz solar.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

En base a todo lo anterior, puede concluirse lo siguiente:

- 1.- Existe asociación entre los alelos *Apa* I y la DMO en el grupo estudiado.
- 2.- La diferencia de DMO entre los homocigotos fue menos marcada que en australianas.
- 3.- Un estudio poblacional complementaría los hallazgos.

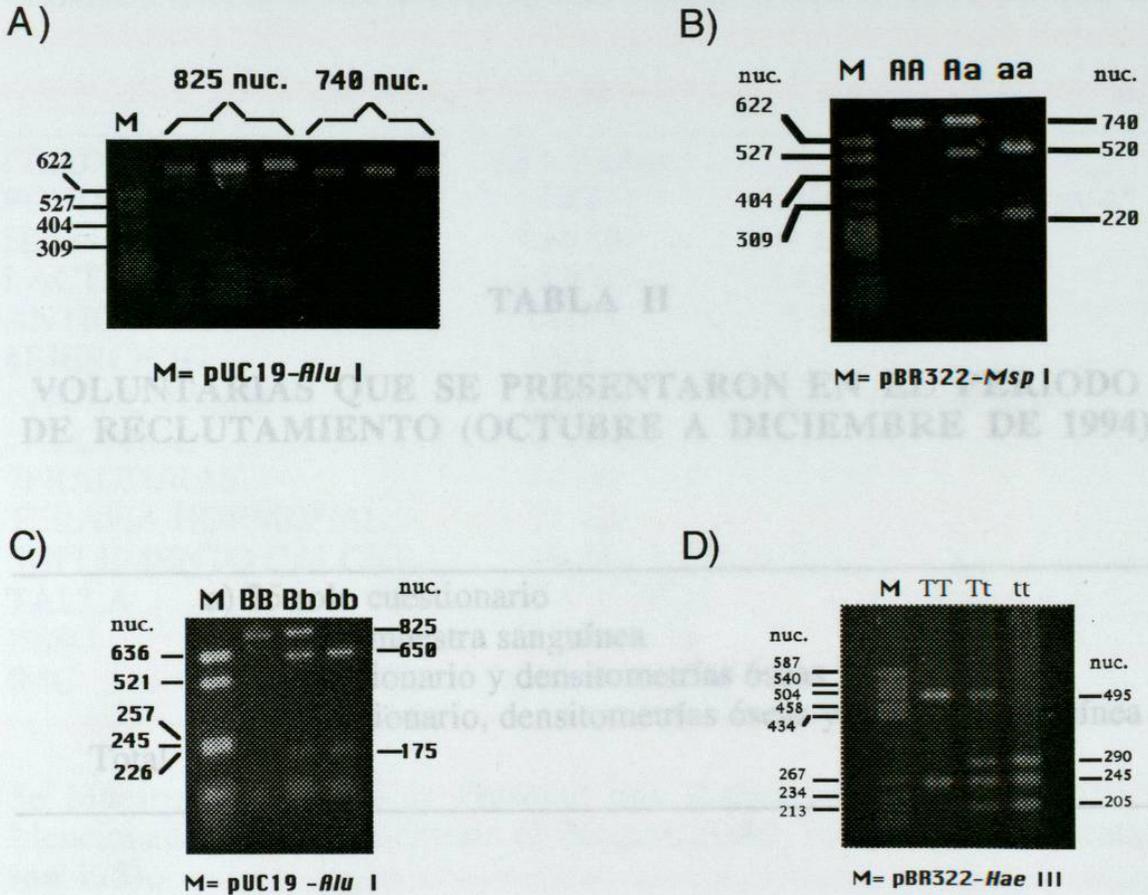


Figura 4. Análisis del DNA. Se Muestran 6 Ejemplos de Productos Amplificados del gen RVD, 3 Para 825 nuc. y 3 Para 740 nuc. (a). Asimismo, se Muestran los Polimorfismos Correspondientes a *Apa* I, *Bsm* I y *Taq* I (b,c y d, Respectivamente).

Letra Mayúscula.- Sitio Polimórfico Ausente

Letra Minúscula.- Sitio Polimórfico Presente

TABLA II**VOLUNTARIAS QUE SE PRESENTARON EN EL PERIODO
DE RECLUTAMIENTO (OCTUBRE A DICIEMBRE DE 1994)**

	a) 25 solo cuestionario
	b) 48 solo muestra sanguínea
	c) 76 cuestionario y densitometrías óseas
	d) 99 cuestionario, densitometrías óseas y muestra sanguínea
Total	248

TABLA III

CARACTERISTICAS GENERALES DEL GRUPO ESTUDIADO

EDAD	53 ± 9 años	
POSTMENOPAUSIA	135(77)	61(45) postquirúrgica*
HIJOS	154(88)	4 ± 2 hijos
LACTANCIA	137(78)	19 ± 22 meses
ANTICON. HORMONALES	69(39)	3 ± 2 años
§EJERCICIO	83(47)	
†TABAQUISMO	61(36)	29(47) exfumador
‡ALCOHOL	63(36)	
◇FRACTURAS	14 (8)	
TERAPIA HORMONAL	21(12)	
SUPLEMENTO CALCIO	19(11)	
TALLA	1.55 ± 0.057m	
PESO	65 ± 10.4 kg	
IMC	26.95 ± 4 kg/m ²	

Se Muestra el Número de Personas que Presentaron la Característica Mencionada y Entre Paréntesis el Porcentaje del Total que Representan (n= 175).

Valores con Media ± DE; n(%); IMC.- Índice de Masa Corporal.

*Menopausia Después de Procedimiento Quirúrgico no Especificado

§Personas que Respondieron si a la Pregunta ¿Hace Usted Ejercicio?

†Al Menos 100 Cigarrillos Durante Toda su Vida

‡Consumo de Alguna Bebida Alcohólica dos o mas Veces al mes

◇Personas que Tuvieron al Menos una Fractura en los Ultimos 5 Años

TABLA IV
FRECUENCIAS ALELICAS DEL GEN RVD

<i>Bsm</i> I	BB* 9(6.6)	Bb 64(47)	bb 63(46.3)
	B=0.301	b=0.698	
<i>Apa</i> I	AA 25(18.6)	Aa 74(55.2)	aa 35(26.1)
	A=0.462	a=0.537	
<i>Taq</i> I	TT 69(51.5)	Tt 62(48.6)	tt 3(2.3)
	T=0.746	t=0.253	

Se Muestra el Número de Personas que Presentaron el Genotipo Correspondiente y Entre Paréntesis el Porcentaje del Total que Representan (n=136 *Bsm* I; n=134 *Apa* I y *Taq* I).

*Letra mayúscula= sitio polimórfico ausente

Letra minúscula= sitio polimórfico presente

TABLA V
DENSITOMETRIAS OSEAS

Región analizada	Media	DE
Fémur:		
Región Trocantérica	0.761	0.129
Triángulo de Ward	0.817	0.168
Cuello	0.893	0.138
Vértebras:		
L2-L4	1.042	0.188

Se Muestra el Promedio y Desviación Estándar de las Densidades Oseas de las Cuatro Localizaciones Corporales Analizadas en el Grupo Estudiado.

n= 149 DMO en gt/cm^2

TABLA VI
ANALISIS DE VARIANZAS (*Apa* I)

	Grupo	n	Media	DE	Relación F	p
Trocánter	AA	16	0.6982	0.1236	4.8498	0.0099
	Aa	52	0.7371	0.1282		
	aa	29	0.8099	0.1245		
Cuello	AA	16	0.8583	0.1433	2.5649	0.0823
	Aa	52	0.8699	0.1327		
	aa	29	0.9356	0.1450		
T. Ward	AA	16	0.7505	0.1685	2.4834	0.0889
	Aa	52	0.7918	0.1679		
	aa	29	0.8593	0.1715		
V.L. 2-4	AA	16	1.0480	0.2043	0.0170	0.9831
	Aa	53	1.0392	0.1845		
	aa	29	1.0423	0.1824		

Se Muestra el Análisis de Varianzas (ANOVA) de un Solo Sentido Para la Relación del Polimorfismo *Apa* I con la DMO.

DMO en gt/cm^2

TABLA VII

ANALISIS DE CORRELACION

	Peso	Est.	DVL	DFT	DFW	DFC	Taq	Apa	Bsm	Stero	Casu	Mens	Lac.	Hijos	Frac.	Alcoh	Tab.	Ejer.
Edad	.02	.18	-.37*	-.38*	-.56*	-.52*	.01	-.22	-.20	.13	.12	.59*	.20	.05	.17	.04	-.04	.01
Ejer.	.00	-.11	.00	-.05	-.01	.02	.02	-.08	-.05	-.16	-.04	-.02	.23	.09	-.14	.19	.05	.01
Tab.	-.01	.08	-.09	-.12	-.08	-.04	.07	-.03	-.06	-.31†	.09	-.20	.12	-.09	.00	.15	1.00	
Alcoh	-.01	-.18	-.09	-.04	-.06	-.04	-.16	.17	.21	-.18	-.06	-.11	.23	.07	-.25	1.00		
Frac.	-.16	-.15	-.12	-.16	-.16	-.19	.05	.01	-.02	-.10	-.07	.00	.06	-.00	1.00			
Hijos	.11	.02	-.11	.02	-.03	-.07	-.12	-.02	.00	-.01	-.19	.07	.41*	1.00				
Lac.	.18	-.04	-.25	-.07	-.15	-.16	-.14	.13	.05	-.20	-.04	.07	1.00					
Mens	.10	.06	-.42*	-.23	-.40*	-.38*	.04	-.12	-.15	.20	.13	1.00						
Casu	-.07	.12	.05	.03	.04	-.06	.05	-.06	-.11	.05	1.00							
Stero	-.15	-.05	.03	.03	-.07	-.06	-.02	-.04	-.06	1.00								
Bsm	-.04	-.30*	-.00	.11	.14	.17	-.83*	.63	1.00									
Apa	.20	-.21	.15	.36†	.29†	.29†	-.62*	1.00										
Taq	-.04	.22	.05	-.09	-.09	-.10	1.00											
DFC	.11	-.11	.77*	.86*	.96*	1.00												
DFW	.08	-.11	.77*	.86*	1.00													
DFT	.22	-.21	.68*	1.00														
DVL	.09	-.12	1.00															
Est.	.36*	1.00																
Peso	1.00																	

Se Muestra el Grado de Asociación que Presentaron Entre sí las Variables Consideradas Para Este Estudio.

Simbología.- Ejer.=ejercicio; Tab.=tabaquismo; Alcoh.=consumo de alcohol; Frac.= antecedente de fracturas; Lac.=lactancia; Mens=menstruación; Ca su.=suplementos de calcio; Stero.=estrógenos de reposición; Bsm=RFLP Bsm I; Apa=RFLP Apa I; Taq=RFLP Taq I DFC=DMO cuello; DFW= DMO triángulo de Ward; DFT=DMO trocánter; DVL=DMO vértebras lumbares; Est.=estatura.

*= significancia al nivel 0.001

†= significancia al nivel 0.01

TABLA VIII
REGRESIONES MULTIPLES

(80)Cuello del Fémur rm=0.629		1.265-0.0071(edad)+0.0046(<i>Apa</i> I) -0.179(fractura)			
$r^2=39.6$	p Δr^2	0.0001 28.6	0.007 6.8	0.0279 4.2	
(85)Triángulo de Ward rm=0.6699		1.37-0.0096(edad)+0.005(<i>Apa</i> I) -0.011(lactancia)			
$r^2=44.9$	p Δr^2	0.0001 37.8	0.011 3.8	0.034 3.3	
(85)Trocánter rm=0.56		0.991 -0.0047(edad) +0.0059(<i>Apa</i> I) -0.162(fractura)			
$r^2=31.34$	p Δr^2	0.0001 17.6	0.0006 9.9	0.04 3.7	
(81)Lumbares2-4 rm=0.523		1.18-0.161(menopausia)-0.0021(lact,frac)+0.0013(<i>Apa</i> I)			
$r^2=27.4$	p Δr^2	0.0002 17.9	0.005 5.4	0.04 4.1	

Análisis de Covarianza Para las Variables Consideradas en el Estudio en Relación a la DMO.

Variables candidatas: edad, *Apa* I=genotipo⁶, menopausia, # embarazos, lactancia(meses), IMC, antecedentes de fracturas en los últimos 5 años, ejercicio, tabaquismo y consumo de alcohol.

REFERENCIAS

1. Parfitt A.M. 1982. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Relat Res* 4:1.
2. Parra-Cabrera M.S., Hernández-Avila M., Tamayo y Orozco J.A., Fernández M.C., Meneses F. Factores de Riesgo en la Osteoporosis: Evidencias Clínicas y Epidemiológicas. Revista del Instituto Mexicano del Seguro Social.
3. Cummings S.R. 1985. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev* 7: 178-208.
4. Auerbach G.D., Marx S.J., Spiegel A.M. Metabolic Bone Disease. Wilcon and fosters eds. The Textbook of Endocrinology. Eight edition. Saunders.1990, 1503-5.
5. Heaney R.P. 1993. Thinking straight about calcium. *N Engl J Med* 328: 503-5.
6. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Bioquímica de Harper 11ª ed. Editorial EL Manual Moderno. 1988: 506.
7. Clemens T.L., Adams J.S., Henderson S.L., Holick M.F. 1982. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*.: 74-6.
8. Culliton B.J., 1987 Osteoporosis Reexamined: Complexity of Bone Biology Is a Challenge. *Science* . 235: 833-4.
9. Aloia J.F., Vaswani A., Yeh J.K., Cohn S.H. 1988. Premenopausal Bone Mass is Related to Physical Activity. *Arch. Intern. Med* 148: 121-3.

10. Oyster N., Morton M., Linnell Sh. 1983. Physical activity and osteoporosis in post-menopausal women. *Med. Sci. Sports Exerc.* **16**: 44-50.
11. Bauer D.C., Browner W.S., Cauley J.A., Orwoll E.S., Scott J.C., Black D.M., Tao J.L., Cimmings R.S. 1993. Factors associated with appendicular bone mass in older women. *Ann Intern Med*; **118**: 657-65.
12. Recker R.R., Lappe J.M., Davies K.M.1992. Change in bone mass immediately before menopause. *J Bone Min Res* **8**: 857-62.
13. Sowers M.R., Clark M.K., Hollis B.1992 Radial bone mineral density in pre-and perimenopausal woman: prospective study of rates and risk factors for loss. *J Bone Min Res* **6**: 647-57.
14. Antunes C.M.F., Stolley P.D., Rosenshein N.B., Davies J.L., Tonascia J.A., Brown Ch., Burnett L., Rutledge A., Pokempner M.,García R 1979.Endometrial Cancer and Estrogen Use. *N Engl J Med* **300**: 9-13.
15. Robbins S.L., Cotran R.S. Patología estructural y funcional 3ª ed. Editorial Interamericana. 1987.
- 16.Hunder G.G., Kaye R.L., Williams R. 1993. Osteoarthritis, osteoporosis, fibromyalgia: advances in understanding and management. *J Musculoesk. Med.* **10**: 16-32.
17. Barreira M.E., Vázquez V.S.E., García D.F., Villanueva A.M. 1993 Osteoporosis en Reumatología y Ortopedia. *Rev. Mex. Reumat.* **8**: 2-5.
18. Nilsson B.E. 1969. Parity and osteoporosis. *Surgery,Gynecology & Obstetrics* : 27-8.
19. Christian J.C., Yu P.L., Slemenda C.W., Johnston C.C. 1984. Heretability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* **44**: 429-33.

20. Kelly P.J., Hopper J.L., Macaskill G.T., Pocock N.A., Sambrook P.N., Eisman J.A. 1991. Genetic Factors in Bone Turnover. *J Clin. Endocrinol. Metab.* **72**: 808-13.
21. Seeman E., Hopper J.L., Bach L.A., Cooper M.E., Parkinson E., McKay J, Jerums G. 1989. Reduced bone mass in daughters of women with Osteoporosis. *N. Engl. J Med.* **320**: 554-8.
22. Morrison N.A., Yeoman R., Kelly P.J., Eisman J.A. 1992. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 6665-9.
23. Morrison N.A., Cheng Q.J., Tokita A., Kelly P.J., Crofts L., Nguyen T.V., Sambrook P.N., Eisman J.A. 1994. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* **367**: 284-7.
24. Hassard T.H. Understanding Biostatistics. Mosby Year Book. 1991.
25. Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
26. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
27. Martinez-Soriano J.P., Cab Barrera E.L., Tamez González R., Leal Klevezas D.S. 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquimia* **18**: 10-16.
28. Barrera Saldaña H.A., Ortíz López R., Rojas Martínez A., Reséndez Pérez D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. *Ciencia y Desarrollo* : 50-60.
29. Singer M., Berg P. Genes and Genomes. University Science Books. 1991.

30. Rizzoli R., Solosman D., Bonjour J.P. 1995. The role of dual energy x-ray absorptiometry of lumbar spine and proximal femur in the diagnosis and follow-up of osteoporosis. *Am J Med* (supl 2A), 29S-36S.
31. SPSS Statistic guide. McGraw-Hill Book Company. Norusis MJ New York SPSS Inc., 1983.
32. Yamagata Z., Miyamura I.T., Iijima S. 1994. Vitamin D receptor polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet* **344**: 1027.
33. Spector T.D., Keen R.W., Arden N.K. 1994. Vitamin D receptor gene (VDR) alleles and bone density in postmenopausal women: a UK twin study. *J Bone Min Res* **9**: 143.
34. Ferrari S., Rizzolli R., Chevalley T., Slosman D., Eisman J.A., Bonjour J.P. 1995. Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet* **345**: 423-4.
35. Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos, 1994. INEGI.
36. Stern M.P., González C., Mitchell B.D., Villalpando E., Haffner S.M., Hasuda H. 1992. Genetic and enviromental determinants of type II diabetes in Mexico City and San Antonio. *Diabetes* **41**: 484-92.
37. Posadas C., Fajardo A., Yamamoto L., Velázquez L., Lerman I. 1994. The prevalence of NIDDM and associated coronary risk factors in Mexico City. *Diabetes Care* **17**: 1441-8.
38. Thompson M.W., McInnes R.R., Willard H.F. eds. Genes in Population. En *Genetics in Medicine*, 5^a ed. 1991. Philadelphia WB Saunders Company Harcourt Brauce Jovanovich Inc., 143-66.
39. Heaney R.P. 1993. Bone mass, nutrition and life style factors. *Am J Med* (supl 5A), 29S-36S.
40. Shaw G., Kamen R. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**:659-67.

41. Murphy D., Pardy K., Seah V., Carter D. 1992. Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol Cell Biol* 12: 2624-32.
42. Hustmyer F.G., Peacock M., Hui S., Johnston C.C., Christian J. 1994. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 94: 2130-4.
43. Melhus H., Kindmark A., Amér S., Wilén B., Lindh E., Ljunghall S. 1994. Vitamin D receptor genotypes in osteoporosis. *Lancet* 344: 949-50.
44. Parfitt A.M., 1990. Bone forming cells in clinical conditions. Hall B.K. ed. *The osteoblast and the osteocyte*. Telford Press/CRC Press; 1: 351-429.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Gilberto Jaramillo Rangel

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: ALELOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y SU RELACION CON LA DENSIDAD MINERAL OSEA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 19 de Junio de 1970, hijo de Gilberto Jaramillo Cardona y Ma. del Refugio Rangel Rosas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Químico Clínico Biólogo en 1992.

