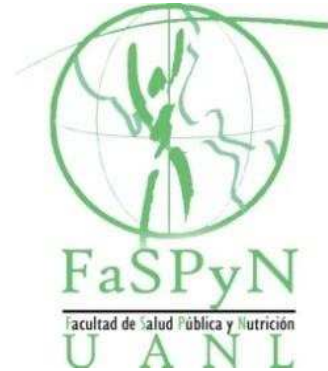
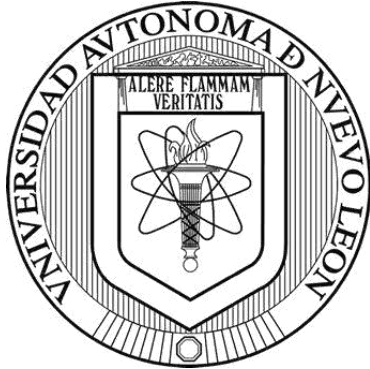


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**ASOCIACIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA CON EL POLIMORFISMO
Taq1 DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL CONSUMO DE
CAFEÍNA EN MUJERES JÓVENES**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

PRESENTA

ESTHER ALHELÍ HERNÁNDEZ TOBÍAS

MONTERREY, NUEVO LEÓN

NOVIEMBRE DE 2011

AGRADECIMIENTOS

El más sincero agradecimiento al Dr. Zacarías Jiménez Salas por su asesoría y dirección en todos los momentos de la tesis y por todas las facilidades que me otorgó para la realización de la misma.

A los compañeros del laboratorio de genética y biología molecular del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición por su disposición y colaboración en la etapa experimental de la investigación.

Al Dr. Eduardo Campos Góngora por sus acertados comentarios que permitieron mejorar esta investigación.

Al Dr. Erik Ramírez López por su disposición para la planeación y desarrollo de la parte experimental de la investigación, así mismo al laboratorio de gasto energético por su participación en las determinaciones antropométricas.

Al laboratorio de composición corporal por su colaboración en la determinación de la densidad mineral ósea.

Al Dr. Marco Vinicio y a la Ingeniero Silvia Osorio por sus asesorías en el análisis estadístico de los datos.

A mis maestros, compañeras y compañero de la maestría en ciencias en nutrición por las enseñanzas y buenos recuerdos que dejaron en mí.

A la Facultad de Salud Pública y Nutrición por la beca que me otorgó.

DEDICATORIA

A mis padres Guadalupe y Esther Idalia que han sido un ejemplo para mi crecimiento, gracias al apoyo incondicional de mi madre y la seguridad que mi padre inculcó en mí, hoy termino una etapa más en mi vida.

A mi hija que me acompañó y dio ánimos el segundo año de maestría, tomando clases conmigo y realizando cada una de las etapas de la tesis, Tessy a quien ahora conozco cara a cara y amo con todas mis fuerzas.

A mi hermano Pepe Tobías, que no solo es familia sino mi mejor amigo, cuyo sentido del humor me dio ánimos en los momentos más estresantes.

A mi abuelita Esther que me acompañó hasta el final del primer semestre y tenemos una cita pendiente que algún día cumpliré.

A mis amigas y amigos que tuvieron la paciencia de escucharme, ayudarme cuando lo necesitaba y darme consejos cuando se los pedía.

Finalmente a Fernando, mi esposo, que ha sido una gran compañía en este viaje, amigo incondicional e inigualable compañero de vida.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Clasificación de la densidad mineral ósea.	11
II. Componentes para la amplificación por PCR.	30
III. Condiciones de PCR.	31
IV. Características generales del grupo de estudio.	34
V. Densidad mineral ósea (g/cm ²) en diferentes regiones anatómicas del grupo de estudio.	35
VI. Frecuencia de genotipos y alelos del polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR.	38
VII. Asociación de la DMOt con diferentes factores.	40
VIII. Asociación de la DMOdf con diferentes factores.	40
IX. Asociación de la DMO con el polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR y con el consumo diario de cafeína.	41
X. Asociación de la DMO con el polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR utilizando la prueba ANOVA	42
XI. Asociación de la DMO con el polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR según el nivel de consumo de cafeína.	43
XII. Asociación de la DMO con el polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR según los niveles de consumo de cafeína.	43
XIII. Densidad mineral ósea de diversas poblaciones.	45
XIV. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR y las reportadas en otros estudios.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema de las vías de la remodelación ósea y los factores que intervienen.	9
2.	Ubicación de los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D.	18
3.	Estrategia general de trabajo para la investigación.	25
4.	DNA extraído a partir de sangre periférica.	36
5.	Productos de la amplificación por PCR de un fragmento del gen VDR.	36
6.	Secuencia nucleotídica del fragmento de 745 pb del gen VDR y representación gráfica de los fragmentos esperados por genotipo.	37
7.	Productos de digestión del polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR.	38

LISTA DE SÍMBOLOS

Nomenclatura	Significado
cm	Centímetros
DMO	Densidad mineral ósea
DMOdf	Densidad mineral ósea dual de fémur
DMOt	Densidad mineral ósea total
DXA	Absorciometría dual de rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
IMC	Índice de masa corporal
kg	Kilogramos
L	Litros
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	Pico Moles
s	Segundos
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
VDR	Receptor de la vitamina D
μl	Microlitros
μM	Micromolar
WHO	World Health Organization
DE	Desviación estándar
ANOVA	Análisis de varianza

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
3.- HIPÓTESIS	4
4.- OBJETIVOS	5
4.1 General	5
4.2 Específicos	5
5.- ANTECEDENTES	6
5.1 Tejido óseo	6
5.1.1 Estructura	6
5.1.2 Remodelación ósea	6
5.1.3 Factores que participan en la remodelación ósea	7
5.2 Densidad mineral ósea	10
5.3 Osteoporosis como problema de salud pública	11
5.4 Marcadores de riesgo y prevención de la osteoporosis	13
5.5 Influencia genética en la densidad mineral ósea	14
5.5.1 Genes que participan en la remodelación ósea	15
5.5.2 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)	16
5.5.3 Polimorfismos asociados a la densidad mineral ósea	17
5.5.4 Receptor de la vitamina D	17
5.5.5 Polimorfismos del gen VDR y la densidad mineral ósea	18
5.6 La cafeína como factor de riesgo de osteoporosis	20
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Materiales	23
6.2 Métodos	23
6.2.1 Diseño del estudio	23

6.2.2 Estrategia general	25
6.2.3 Obtención de la información	26
6.2.3.1 Densitometría ósea	26
6.2.3.2 Polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR	27
6.2.3.2.1 Extracción de DNA con el método de buffer de lisis TSNT	28
6.2.3.2.2 Electroforesis en geles de agarosa	29
6.2.3.2.3 Amplificación de DNA genómico	29
6.2.3.2.4 Digestión enzimática del segmento amplificado	31
6.2.4 Determinación del consumo de cafeína	32
6.2.5 Análisis estadístico	33
7. - RESULTADOS	34
7.1 Características generales del grupo estudiado	34
7.2 Determinación de la densidad mineral ósea	35
7.3 Análisis del polimorfismo <i>TaqI</i> del gen VDR	35
7.4 Determinación del consumo de cafeína	39
7.5 Asociación de la DMO con factores antropométricos	39
7.6 Asociación de la DMO con el polimorfismo <i>TaqI</i> del gen del receptor de la vitamina D y con el consumo de cafeína	41
8.- DISCUSIÓN	44
9.- CONCLUSIONES	52
10.- LITERATURA CITADA	53
ANEXOS	64

1.- RESUMEN

Introducción: La osteoporosis es una enfermedad que afecta al 17% de la población mexicana y en la que se involucran factores dietéticos, ambientales y genéticos. Esta patología es un problema de salud para el país ya que el costo por atención de fracturas secundarias a osteoporosis es elevado y muchas veces deja al paciente incapacitado para trabajar. La osteoporosis ha sido asociada a una baja densidad mineral ósea, al polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D (VDR) y al consumo de cafeína. Ya que en la juventud se alcanza el pico de la DMO, se considera éste el mejor momento para la prevención de osteoporosis **Objetivo:** Analizar la asociación de la densidad mineral ósea con los diversos genotipos del polimorfismo *TaqI* y con el consumo de cafeína en mujeres jóvenes. **Métodos:** A 150 mujeres de 19 a 29 años de edad se les realizó una absorciometría dual de rayos X para determinar su densidad mineral ósea total (DMOt) y dual de fémur (DMOdf). A partir de DNA extraído de sangre venosa se determinó el genotipo del polimorfismo *TaqI* del gen VDR. Además, se les aplicó un cuestionario de frecuencia de consumo de cafeína para identificar el consumo diario de esta sustancia. Los datos obtenidos se analizaron mediante pruebas de J_i^2 , regresión lineal simple y ANOVA. **Resultados:** El promedio de la DMOt fue de 1.096 ± 0.064 g/cm², la DMOdf promedio fue de 0.960 ± 0.107 g/cm². La frecuencia de los genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen VDR fue de 57% (TT), 37% (Tt) y 6% (tt), la frecuencia por alelos fue de 75% (T) y 25% (t). El consumo de cafeína promedio fue de 49.07 ± 91.53 mg/día. El análisis estadístico demostró que no existe asociación entre la DMO con el genotipo o con el consumo de cafeína. **Discusión y Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que tal vez existen otros factores diferentes del polimorfismo *TaqI* del gen VDR y el consumo de cafeína que podrían contribuir de una manera más significativa a la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes del norte de México.

2.- INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una baja densidad mineral ósea y un deterioro de la microarquitectura del hueso; es silenciosa, progresiva, de alto costo para el sector salud y desgastante para quien la padece. El mayor gasto para el paciente con osteoporosis se debe a las fracturas secundarias las cuales ocasionan gastos hospitalarios de internamiento, cirujanos, prótesis (dependiendo de la fractura) y microcostos incalculables para la atención de las mismas; además, los pacientes pierden días laborales y en el peor de los casos, la capacidad de volver a trabajar o participar en las labores domésticas, trastocando la economía y organización familiar. México es un país cuya población de adultos mayores se incrementa en forma considerable por lo que es necesario tomar medidas preventivas para enfrentar esta enfermedad.

La etiología de la osteoporosis involucra factores genéticos, ambientales y dietéticos. En los últimos años, el estudio de los factores genéticos asociados a esta enfermedad se incrementó considerablemente; entre los genes más analizados se encuentran los que codifican para proteínas relacionadas con la absorción del calcio, tales como el gen que codifica para el receptor de la vitamina D; el receptor de la vitamina D unido a esta vitamina forman un complejo que se une a factores transcripcionales para promover la síntesis de proteínas que facilitan la introducción de calcio al citoplasma. También se ha estudiado la asociación de los polimorfismos de otros genes que participan en las vías del metabolismo óseo tales como ESR1, LRP4, IL6, IL5, etc. con factores como fracturas, densidad mineral ósea, consumo de calcio, vitamina D, etc. Los resultados de estas asociaciones son muy diversos: algunas investigaciones refieren que existe asociación entre factores genéticos con factores dietéticos como consumo de calcio, cafeína, refrescos carbonatados, etc., en otros, se ha asociado la presencia de osteoporosis con la baja densidad mineral ósea en hijas de madres con esta patología y en algunos otros se ha encontrado que ciertos genotipos están relacionados a fracturas secundarias a osteoporosis. En algunos trabajos se reporta que no hay relación entre algunos factores genéticos con la

densidad mineral ósea, el consumo de calcio, de cafeína o con la presencia de fracturas en la etapa postmenopáusica.

Otros factores de riesgo para la aparición de osteoporosis son la actividad física, la dieta, la densidad mineral ósea, el género y la edad. Con respecto a la dieta, algunos estudios describen que el consumo de cafeína disminuye la densidad mineral ósea y acelera la pérdida de la misma. En relación al género y la edad, las mujeres postmenopáusicas son el grupo más propenso a sufrir osteoporosis y fracturas dada su dinámica del metabolismo del calcio. Durante el embarazo y la lactancia las mujeres requieren grandes cantidades de calcio que pueden provenir de la dieta o del esqueleto que funge como almacén de este mineral. Si para cumplir los requerimientos de calcio durante periodos de necesidad incrementada se utilizara el almacén óseo de calcio, se tendría como resultado una densidad mineral ósea disminuida, lo cual podría favorecer la aparición de osteoporosis durante la menopausia.

En este trabajo se consideró importante identificar la asociación entre la densidad mineral ósea de mujeres jóvenes y el polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y el consumo de cafeína. Al concluir el estudio se obtuvieron los valores de densidad mineral ósea, la frecuencia del polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y el consumo promedio de cafeína de mujeres jóvenes de la región. Estos resultados permitieron establecer la asociación entre la densidad mineral ósea con los factores de riesgo en nuestra población.

3.- HIPÓTESIS

La densidad mineral ósea de las mujeres jóvenes se asocia al polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y al consumo de cafeína.

4.- OBJETIVOS

4.1. General

Analizar la relación de la densidad mineral ósea con los diversos genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y con el consumo de cafeína en mujeres jóvenes de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2. Específicos

- Determinar la densidad mineral por medio de absorciometría dual de rayos X en dos sitios, cuerpo total y dual de fémur en mujeres jóvenes.
- Identificar la frecuencia del polimorfismo *TaqI* del gen que codifica para el receptor de la vitamina D en esta población.
- Evaluar el consumo diario de cafeína por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo de cafeína.
- Definir si existe asociación entre la densidad mineral ósea con el polimorfismo *TaqI* del gen receptor de la vitamina D y con el consumo de cafeína.

5.- ANTECEDENTES

5.1.- Tejido óseo

5.1.1.- Estructura

El tejido óseo es un tejido conjuntivo con una gran cantidad de vasos sanguíneos, innervado y mineralizado que está compuesto por minerales unidos a proteínas que favorecen la dureza, flexibilidad y rigidez de la masa ósea (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006); este tejido cumple con dos funciones fundamentales para el cuerpo, dar soporte y almacenar minerales como calcio, magnesio, fósforo, sodio, etc., necesarios para el correcto mantenimiento del cuerpo y sus funciones (Termine, 1993).

El tejido óseo está formado por hueso cortical que provee de fuerza y dureza al esqueleto y por hueso trabecular que favorece al intercambio mineral y contribuye a dar integridad, éste último se encuentra al final de los huesos largos que son los que se someten a un estrés constante, que cuando la masa ósea esta disminuida las fracturas se presentan en estos sitios (Kontulainen *et al.*, 2003).

5.1.2. Remodelación ósea

La masa ósea se renueva constantemente a lo largo de la vida, por el proceso de remodelación ósea llevado a cabo por los osteoblastos y osteoclastos (Lian y Stein, 1992). Los osteoblastos son células derivadas de células madre que se encargan de la síntesis de hueso nuevo, sintetizando colágeno tipo I que es de los principales componentes del tejido óseo (Mundy *et al.*, 2003); al haber terminado el proceso de síntesis los osteoblastos se quedan atrapados en la matriz ósea como osteocitos, los cuales tienen como

función principal detectar el esfuerzo mecánico y las lesiones de la matriz ósea y luego comunicar esta información a los osteoblastos y seguir así con el ciclo de remodelación constante (Aubin *et al.*, 1993).

Por otra parte, los osteoclastos son macrófagos especializados que tienen la capacidad de unirse al hueso y crear un ambiente ácido en su superficie para degradarla, es por esto que el cuerpo los utiliza para remover masa ósea deficiente y así mantener la integridad del tejido (Mikán y Oliveros, 2007).

El balance negativo en este proceso de remodelación ósea, es decir cuando la resorción excede la formación del hueso, ocasiona una fragilidad ósea y por ende padecimientos como osteopenia y osteoporosis (Teitelbaum, 2000).

5.1.3 Factores que participan en la remodelación ósea

El hueso pasa por un recambio constante durante la vida, con el fin de mantener su estabilidad e integridad, a este proceso se le denomina remodelación ósea y consta de cuatro fases. Primero los precursores de osteoclastos maduran y se convierten en osteoclastos multinucleados; luego estos mismos son responsables de la resorción del hueso y formación de una cavidad que dura aproximadamente tres semanas; a continuación la señal de resorción se invierte y por último, se forma hueso nuevo para llenar la cavidad lo cual dura varios meses (Gallagher y Sai, 2010).

Para que los osteoclastos maduren a partir de promonocitos derivados de la célula progenitora hematopoyética se requieren varios factores proporcionados por otras células (osteoblastos), entre estos el factor estimulante de colonias de monocitos (m-SCF) para que a partir de la célula progenitora hematopoyética se formen los promonocitos. Después de que éstos ya formaron precursores de osteoclastos se necesita que se exprese RANKL (ligando del activador del receptor del factor nuclear kappa β), y se una a RANK (activador del receptor del factor nuclear kappa β) y entonces se complete la maduración del

osteoclasto y comience la etapa de resorción. La expresión de RANKL está regulada no sólo por células como osteocitos y osteoblastos sino por otros factores como IL-1 (Interleucina 1), $TNF\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral α), 1,25 dihidroxivitamina D_3 , esta última participa de manera secundaria al permitir la correcta diferenciación de los osteoblastos (Wada *et al.*, 2006).

Al terminar esta primera fase, los osteoclastos se degradan y producen Esfingosina 1 fosfato (S1P), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) y factor de crecimiento hepatocitario (HGF) con lo cual favorecen la supervivencia de los osteoblastos encontrados en la superficie del hueso, la proliferación de precursores de osteoblastos, la síntesis de DNA y la proliferación de osteoblastos, los cuales son necesarios para regenerar el hueso removido (Matsuo e Irie, 2008). Estos osteoblastos comienzan a formar proteínas de la matriz ósea como colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, proteoglicano, sialoproteína ósea, osteopontina, etc. (Gallagher y Sai, 2010); se cree que es la fosfatasa alcalina la que se encarga de la mineralización de la matriz (Wennberg *et al.*, 2000). Cuando la remodelación concluye, los osteoblastos encapsulados permanecen como osteocitos y éstos pueden percibir microfracturas con lo cual permiten la expresión de RANKL para activar la diferenciación de osteoclastos y con esto la resorción ósea en aquellos sitios en los que sea necesaria una remodelación (Boyle *et al.*, 2003).

En conclusión, la diferenciación de osteoclastos requiere de m-SCF y RANKL, de este último su expresión está regulada por los osteocitos al percibir microfracturas y por los osteoblastos que producen RANKL y osteoprotegerina (OPG) que se une a RANKL para evitar la maduración de los precursores de osteoclastos impidiendo que RANKL se una a RANK (Hofbauer y Schoppet, 2004). Para la diferenciación de osteoblastos a partir de la célula mesenquimatosa del estroma se requiere la acción de proteínas tipo wingless, de la vía Wnt, en la cual se requiere un correceptor LRP 5/6 (proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad 5/6) cuya ausencia impide que el osteoblasto se diferencie, causando con esto un déficit

de osteoblastos y una menor remodelación ósea (Bennett *et al.*, 2005). Aunado a esto, los osteocitos sintetizan esclerostina la cual se une al receptor de LRP 5/6 y evita que las proteínas tipo wingless (Proteínas secretadas por la vía de señalización wnt que se encargan de regular diferentes procesos celulares, entre ellos los relacionados a la resorción ósea) permitan la diferenciación de osteoblastos (Glass y Karsenty, 2007). Es así como estas tres células, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, se ven afectadas por múltiples factores como se ilustra en la figura 1.

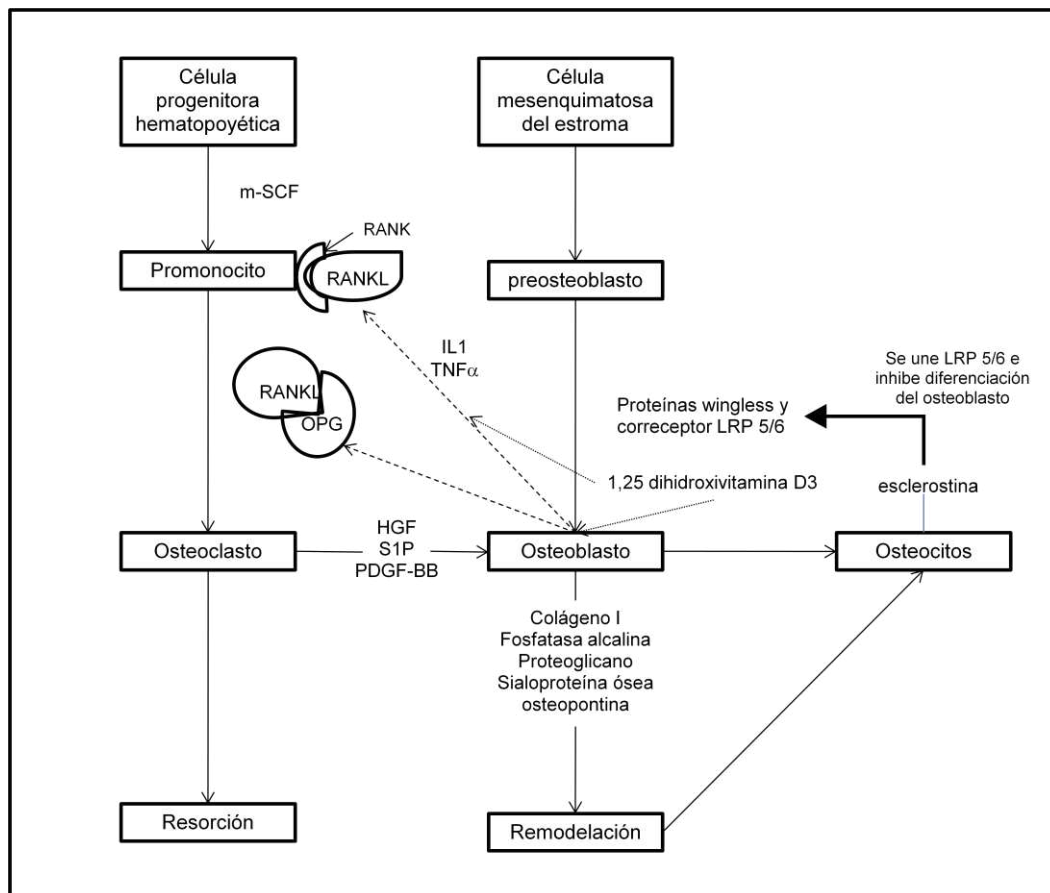


Figura 1.- Esquema de las vías de la remodelación ósea y los factores que intervienen. RANK: activador del receptor del factor nuclear kappa β ; RANKL: Ligando del activador del receptor del factor nuclear kappa β ; OPG: Osteoprotegerina; TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa; IL-1: interleucina 1; vitamina D: 1,25 dihidroxivitamina D₃; m-SCF: Factor estimulante de colonias de monocitos; LRP 5/6: proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad 5/6; S1P: Esfingosina-1-fosfato; PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB y HGF: Factor de crecimiento hepatocitario (modificado de Gallagher y Sai, 2010).

5.2. Densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea (DMO) se define como la cantidad de minerales que tiene el hueso (en especial fósforo y calcio) por unidad de área. La DMO y el tamaño del hueso han sido variables ampliamente estudiadas como las principales determinantes de osteoporosis y de riesgo de fracturas secundarias a osteoporosis (Lazcano-Ponce *et al.*, 2009).

La medición de la DMO se utiliza para diagnosticar osteoporosis, de acuerdo a los valores de T-Score y los parámetros propuestos por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Los valores de la DMO se interpretan como desviaciones estándar en base a los datos obtenidos de la DMO promedio de la población en cuestión, es decir el valor de T-Score considera la densidad mineral ósea promedio de una mujer joven; para determinar esta DMO promedio se toman en cuenta encuestas poblacionales en las que se incluye una muestra representativa de dicha población (Tamayo *et al.*, 2009).

La DMO es uno de los factores que se utiliza con más frecuencia para predecir fracturas y constituye una medida que se puede determinar con alta reproducibilidad y especificidad (Cummings, 2005). Si se llegara a utilizar la DMO para predecir fracturas es indispensable tomar en cuenta el promedio de esta medida en la población mexicana para así considerar un valor de T-Score que refleje el estado óptimo del hueso, esto se logrará adoptando estándares nacionales basados en los valores de referencia de la DMO y T-Score estimados para la población mexicana lo cual permitirá modificar la evaluación de osteoporosis en México (Tamayo *et al.*, 2009). En el año 2009 Tamayo y cols. publicaron tablas que si bien no están incluidas en el software de los equipos para determinar la DMO, se pueden utilizar como valores de referencia y clasificar a los pacientes de acuerdo a su DMO y así obtener el valor de T-Score estimado de acuerdo al promedio de densidad mineral ósea en la población mexicana, ya con este valor de T-Score adaptado, se puede hacer un diagnóstico más certero que con los rangos de desviaciones estándar dados por la OMS que se presentan en la siguiente sección.

5.3. Osteoporosis como problema de salud pública

La osteoporosis tiene como consecuencia una mayor fragilidad ósea y un aumento del riesgo de fracturas (World Health Organization, 2003). Para su diagnóstico se utiliza la medición de la densidad mineral ósea por un equipo de absorciometría dual de rayos X (DXA) que mide los gramos de mineral por unidad de área (Schurman *et al.*, 2007).

Como se muestra en la tabla 1, el diagnóstico de osteoporosis se basa en parámetros establecidos por la OMS, cuando el valor de T-Score, calculado con la densidad mineral ósea en g/cm^2 , se encuentra 2.5 desviaciones estándar por abajo del valor calculado promedio de un adulto joven (Looker *et al.*, 1998).

Tabla I
Clasificación de la densidad mineral ósea**

T-Score	Diagnóstico
-1.0 a + 1.0 DE*	Normal
-1.0 a -2.5 DE	Osteopenia
Menor a -2.5 DE	Osteoporosis

* DE= desviación estándar

** Según valores de la OMS (2003)

Este valor de T-Score se determina con una ecuación en donde se considera la densidad mineral ósea del individuo evaluado, menos la densidad mineral ósea media de un adulto joven del mismo sexo y esto se divide entre la desviación estándar de la población de adultos jóvenes ajustada por género, es decir $(\text{DMO Individuo} - \text{DMO media adultos jóvenes} / \text{DE})$, estos valores son dados por el equipo DXA, con el que se realiza la densitometría ósea y difieren entre uno y otro por las bases de datos integradas en cada equipo (Binkley *et al.*, 2005).

Aunque el diagnóstico de osteoporosis se hace en base al valor de T-Score obtenido por medio de DXA, la absorciometría dual de rayos X no está

disponible para toda la población ya que los costos por estudio pueden ser muy altos y los densitómetros en México son pocos, lo que hace que la osteoporosis se manifieste hasta que ocurra la primera fractura sin tener un diagnóstico previo. Dentro de las fracturas más comunes están la fractura de cadera, columna y muñeca (Clark *et al.*, 2010).

A nivel mundial esta enfermedad afecta a más de 200 millones de personas, especialmente a mujeres postmenopáusicas, de las cuales se calcula que del 30 al 50% desarrollarán esta enfermedad (Melton, 2003). En México, la osteoporosis afecta al 17.9% de la población en general y el 34.5% presenta síntomas de osteopenia que es una condición precursora de osteoporosis (De Lago *et al.*, 2008), por lo que se clasifica como un problema de salud pública (Cole *et al.*, 2009).

La osteoporosis está asociada estrechamente a fracturas de vértebras y en el 2003, las pérdidas económicas por incapacidad debida a esta patología superaron los 400 millones de pesos (Velasco-Murillo *et al.*, 2003), además, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó un aumento del 24.8% en las incidencias de fractura de cadera en el periodo del 2000 al 2006 (Clark *et al.*, 2010). Se estima que el costo por fractura para el IMSS es de 4,365.00 dólares con una estancia hospitalaria de 10 días (Clark *et al.*, 2008).

Además de los altos costos que representa para el sector salud, las complicaciones aunadas a esta patología incluyen la dependencia de los pacientes después de una fractura de cadera, ya que el 10% de las mujeres que la han padecido se vuelven dependientes y necesitan de cuidados especiales; se considera que menos del 50% de la población mundial que ha padecido una fractura secundaria a osteoporosis vuelve a sus actividades habituales, afectando con esto la economía del país, del mismo individuo, el estado anímico del paciente, la economía familiar y la independencia de quien la padece (Brown y Josse, 2002).

5.4.- Marcadores de riesgo y prevención de la osteoporosis

Existen marcadores de riesgo que no se pueden modificar para la osteoporosis, como el género, la raza, menopausia precoz y tratamiento con glucocorticoides. Sin embargo, existen otros marcadores de riesgo que se pueden modificar como el peso, la ingesta de calcio (entre otros nutrientes) y la actividad física (Mitchel *et al.*, 2003). En México, Padilla-Vázquez y cols. (2003) realizaron un estudio de 28 binomios de madre e hija a las cuales se les tomaron medidas antropométricas como peso, talla, circunferencia de cintura y cadera, además se les realizó una absorciometría dual de rayos X en la que se evaluó columna, cadera, cabeza, brazo, pierna, tronco, costillas y pelvis, así como de la columna vertebral (de las vertebrae L2 a L4). En ese estudio el factor que más se relacionó a la DMO en columna vertebral fue la DMO materna. También, se observó que el peso y el porcentaje eran factores relacionados positivamente a la cantidad de DMO en cadera. En ese estudio los autores concluyen que la herencia es el factor que ejerce mayor influencia sobre la DMO de columna vertebral, en cambio, para la DMO de cadera los factores determinantes son el peso y la talla (Padilla-Vázquez *et al.*, 2007).

Debido a que la osteoporosis es de origen multifactorial en la que intervienen factores dietéticos, genéticos y el estilo de vida, la prevención de esta enfermedad es complicada (Rapuri *et al.*, 2001); además de que difícilmente se puede hacer un diagnóstico temprano ya que no presenta síntomas que induzcan a que el paciente se realice una densitometría ósea. Sin embargo, muchos de los casos de osteoporosis se podrían prevenir, antes de que se presente una fractura, mediante una historia clínica dirigida a buscar factores de riesgo que pudiesen influir sobre la densidad mineral ósea como son el consumo de cafeína, de bebidas carbonatadas, el consumo de tabaco y los factores genéticos, entre otros (Schurman *et al.*, 2007). En la población joven es de suma importancia disminuir los niveles de consumo de cafeína ya que desde hace varios años se ha relacionado a esta sustancia con una baja densidad mineral ósea (Barrett-Connor *et al.*, 1994).

Las medidas preventivas para alcanzar una densidad mineral ósea ideal en la juventud, así como el estudio genético que permita identificar las variantes polimórficas de riesgo, deben ser consideradas como prioridad en la población mexicana.

5.5.- Influencia genética en la densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea y la calidad de la microarquitectura del hueso son fenotipos heredables que participan en la patogénesis de la osteoporosis (Ferrari, 2008). Desde hace décadas se ha relacionado al factor hereditario con la presencia de osteoporosis demostrando, por medio de estudios familiares y de gemelos, que entre el 50 y el 85% de la variación de la densidad mineral ósea observada en sujetos de la misma edad y sexo se puede atribuir a factores genéticos (Pocock *et al.*, 1987).

Se estima que una mujer cuya madre ha tenido una fractura de cadera tiene el doble de probabilidades de padecer una fractura (Kanis *et al.*, 2008). En un estudio realizado en México con 591 pares de madres e hijas se observó que las hijas de madres con DMO baja para su edad, tenían también una baja densidad mineral ósea comparada con aquellas cuyas madres tenían una masa ósea normal (Lazcano-Ponce *et al.*, 2009).

Fue sencillo asociar a la densidad mineral ósea con la heredabilidad (Ferrari *et al.*, 2006), sin embargo, tratar de ligar el factor genético a las fracturas secundarias a osteoporosis ha sido más complicado ya que solo se ha podido comprobar que menos del 50% de las fracturas son atribuibles a la herencia y dependen del tipo de fractura así como de la edad al ocurrir el evento (Michaelsson *et al.*, 2005). Lo anterior, se puede explicar considerando que las fracturas dependen de otros factores que afectan más a la presencia de las mismas, como el ser propenso a caídas, vivir en soledad o en un hogar con escalones, tener un estado físico débil, entre otros factores de riesgo. Aunado a esto se ha reportado que las fracturas son, en parte, independientes de la

densidad mineral ósea (Kanis *et al.*, 2007), por lo que los polimorfismos contribuyen a la variación de la densidad mineral ósea, pero no siempre a la presencia de fracturas (Andrew *et al.*, 2005).

5.5.1. Genes que participan en la remodelación ósea

Algunos genes asociados al recambio óseo se han estudiado debido a su posible relación con la presencia de osteoporosis. Entre los genes analizados destaca el del VDR, ya que codifica para el receptor de la vitamina D, por lo que es necesario para que dicha vitamina se introduzca a las células y participe como factor de transcripción para la síntesis de proteínas que permitan la correcta absorción de calcio y que favorezca la mineralización de la matriz ósea. Además de esta función, la vitamina D también participa en la expresión de RANKL, factor necesario para la diferenciación de los osteoclastos (Piccoto *et al.*, 2007).

Otros genes asociados con el metabolismo óseo incluyen a COLIA1 y COLIA2, situados en el cromosoma 17 y 7 respectivamente, que codifican para la colágeno tipo I que es una proteína sintetizada por los osteoblastos y es parte fundamental de la matriz ósea (Hustmyer *et al.*, 1999). Además el gen IGF-I, localizado en el cromosoma 12 que codifica para el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), es un polipéptido que participa en la maduración del osteoblasto así como en la síntesis de colágeno (Rosen *et al.*, 1998).

El gen ESR1, que codifica para los receptores de estrógenos, ubicado en el cromosoma 6, se asocia a la densidad mineral ósea ya que se ha reportado que tienen efectos benéficos sobre el desarrollo y mantenimiento del esqueleto (Picotto *et al.*, 2007).

Así mismo, el gen LRP5 también se ha propuesto como un candidato para que pueda tener influencia sobre los fenotipos óseos a nivel poblacional ya que LRP5 está estrechamente relacionado con su homólogo LRP6 y estos dos funcionan como receptores de la membrana celular para proteínas específicas

tipo wingless necesarias para la diferenciación de los osteoblastos. Algunos investigadores publicaron que el polimorfismo de LRP5 contribuye a la variación en la densidad de masa ósea en la población (Urano *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2005).

5.5.2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

El genoma puede sufrir mutaciones o cambios de una sola base nitrogenada por otra, con lo que se puede ocasionar reemplazos de aminoácidos de la proteína codificada. Cuando el cambio está presente en al menos el 1% de la población estas mutaciones se denominan polimorfismos de un solo nucleótido, (SNPs) y son los responsables de la variabilidad en el fenotipo observado entre los seres humanos. Estas modificaciones son comunes en la población, se estima que existen 10 millones de SNPs en el genoma humano de los cuales 60000 están dentro de las secuencias que codifican para proteínas (Karp, 2005).

Un grupo internacional encargado de hacer mapas de estos polimorfismos de un solo nucleótido (The International SNP Map Working Group) publicó en el 2001, que las diferencias en la secuencia del DNA (polimorfismos de un solo nucleótido) contribuyen no solo a las variaciones fenotípicas, sino que influyen en el riesgo de padecer enfermedades (la susceptibilidad a las mismas) y en la respuesta de cada individuo al ambiente (Sachidanandam *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque varias enfermedades se han relacionado a estos polimorfismos, no siempre se ha obtenido el éxito esperado ya que por lo regular son consistentes con una arquitectura genética más compleja y es que, si cada locus contribuye de forma discreta a la etiopatogenia de cierta enfermedad es menos probable ver una asociación significativa de un solo polimorfismo con la enfermedad.

5.5.3. Polimorfismos asociados a la densidad mineral ósea

Diversas investigaciones sugieren que varios polimorfismos están asociados a la densidad mineral ósea, a la osteoporosis o al riesgo de fracturas; recientemente, un meta-análisis concluyó que 9 polimorfismos (ESR1, LRP4, 1TGA1, LRP5, SOST, SPP1, TNFRSF11A, TNFRSF11B y TNFRSF11) se asocian significativamente a la densidad mineral ósea (medida en cuello de fémur y columna) y otros cuatro se asociaron a un riesgo de fracturas (Richards *et al.*, 2009). Varios de estos polimorfismos se asocian a la densidad mineral ósea porque están en genes que intervienen en los procesos de remodelación ósea o en el proceso de adquisición del pico de masa ósea en la población, como ESR1 que codifica para receptores de estrógenos, LRP5 que funge como correceptor de proteínas de la vía Wnt y SOST que codifica para esclerostina, proteína que se une a LRP 5/6 e inhibe la diferenciación de osteoblastos. Otro polimorfismo asociado a la densidad de la masa ósea es el que se encuentra en el intrón 1 del gen del colágeno 1 α 1, el cual se asoció con el riesgo de fracturas en población alemana, sueca y danesa (Uitterlinden *et al.*, 1998; Langdahl *et al.*, 1998 y Liden *et al.*, 1998). Mientras que en la población francesa, este polimorfismo se asoció a la densidad mineral ósea, pero al ajustar por edad esta asociación no fue significativa (Eisman, 1999).

5.5.4. Receptor de la vitamina D

La vitamina D es considerada una hormona indispensable para la correcta absorción del calcio por órganos como riñón, intestino, paratiroides, hueso y sistema inmunitario, que necesita unirse al receptor de la vitamina D para ser transportada al interior de las células donde se requiera; este receptor es codificado por el gen del receptor de la vitamina D (gen VDR, por sus siglas en inglés). Esta proteína es la encargada de mediar la acción biológica de la vitamina D para la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo (Cusack y

Cashman, 2003). El gen VDR está localizado en el cromosoma 12, tiene un tamaño de 5,6 Kb de DNA genómico (Gómez-Alonso *et al.*, 2001), sin embargo, es en la región no codificante del gen donde se encuentra la mayoría de los polimorfismos que se presume pueden modificar la transcripción del gen o la estabilidad del RNA mensajero (Fang *et al.*, 2005).

5.5.5. Polimorfismos del gen VDR y la densidad mineral ósea.

El gen VDR tiene 9 exones, en este gen se han reportado 5 polimorfismos de un solo nucleótido, *Cdx2* en la región promotora, *FokI* en el exón 2, *BsmI* y *ApaI* en el intrón 8 y *TaqI* en el exón 9 (figura 2). A estos polimorfismos se les da el nombre debido a las enzimas de restricción utilizadas en la diferenciación de los polimorfismos, los genotipos de los polimorfismos provenientes de cada uno de estos sitios se denominan dependiendo de la primera letra de la enzima por la cual haya sido digerido el DNA genómico. Específicamente, el polimorfismo *TaqI* recibe su nombre ya que el sitio TCGA es reconocido por la enzima de restricción *TaqI*; los genotipos que genera son TT, Tt y tt, indicando con minúscula el sitio de corte para la enzima.

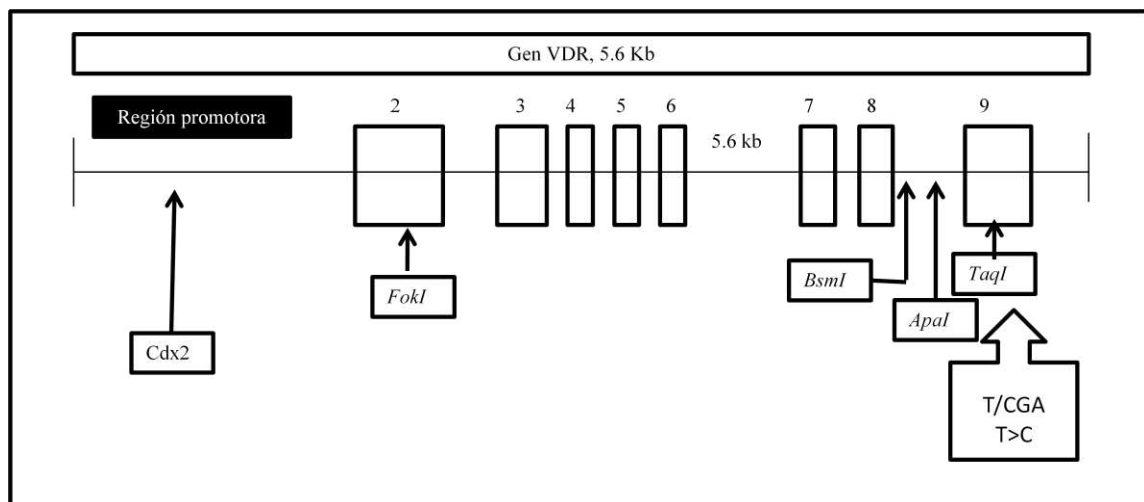


Figura 2.- Ubicación de los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D. Se muestra la estructura del gen VDR y la ubicación de intrones (espacios vacíos) y exones (recuadros blancos); así como el sitio de restricción para *TaqI* (tomado de Blanco-Quirós *et al.*, 2009)

El polimorfismo *TaqI* del gen VDR ha sido ampliamente relacionado con la osteoporosis por la disminución de la DMO (Fang *et al.*, 2005), sin embargo, estos hallazgos han sido contradictorios ya que en estudios realizados con diversas poblaciones no se ha encontrado una asociación significativa entre los polimorfismos del gen VDR y los niveles de densidad mineral ósea (Uitterlinden *et al.*, 2006).

En un estudio con 634 mujeres mayores de 55 años se analizó la relación de los polimorfismos *BsmI*, *Apal*, *TaqI* del gen VDR y los del gen del receptor de estrógenos (ESR1) con el incremento de fracturas; se encontró que la interacción de estos polimorfismos causa un aumento en el riesgo de fracturas vertebrales secundarias a osteoporosis (Colin *et al.*, 2003).

Años después, un grupo de investigadores realizó un estudio para examinar si los genotipos del gen VDR contribuyen a las fracturas de cadera en mujeres postmenopáusicas, utilizando una muestra de 677 mujeres de origen caucásico, determinaron su DMO por el método de absorciometría dual de rayos X, e incluyeron solamente al polimorfismo *TaqI* del gen VDR. Encontraron que el genotipo *tt* tiene una prevalencia del 16% en esa población y un incremento en el riesgo de fractura de cadera (OR 2.5) concluyendo que un 20% de las fracturas de cadera eran causa del genotipo *tt* (Nguyen *et al.*, 2005). En ese mismo año se publicó otro estudio en 589 mujeres postmenopáusicas, donde se les midió la DMO por el mismo método, pero esta vez al inicio del estudio y 14 años después, concluyeron que los genotipos del gen VDR se asocian con el riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas independientemente de la DMO (Garnero *et al.*, 2005).

En investigaciones más recientes, se estudió a 126 mujeres adultas mayores de la región del Bio Bio, al sur de Chile, en esta muestra incluyeron a 67 mujeres con fractura de cadera y 59 sin fractura que eran consideradas como grupo control; se analizaron los polimorfismos *BsmI*, *Apal*, *TaqI* y *FokI* del gen VDR y su asociación al riesgo de fractura de cadera, sin considerar la DMO y concluyeron que los alelos del gen VDR no influyen con el riesgo de fractura de

cadera, pero están asociados a otros alelos de otros genes vecinos relacionados con el metabolismo óseo. Sin embargo, estas conclusiones se pueden deber a que el número de muestra fue muy pequeño y carecía de poder estadístico suficiente para demostrar una asociación entre los polimorfismos y las fracturas de cadera, además de que era una población étnicamente heterogénea (Quevedo *et al.*, 2008).

En la población japonesa se estudiaron a 162 mujeres premenopáusicas de 22 a 44 años a las cuales se les determinó la DMO y a partir de muestras de sangre se determinaron los genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen VDR, si bien en esta población no se encontraron individuos con el genotipo tt, se observa una asociación negativa de la DMO con el genotipo Tt de este polimorfismo (Funakoshi *et al.*, 2010).

En la población mexicana, Jaramillo-Rangel y cols. (1999), analizaron a 98 mujeres mayores de 25 años, sin diagnóstico previo de osteoporosis, no embarazadas y no lactantes. Se les midió la DMO en la espina lumbar y en el fémur proximal por el método de absorciometría dual de rayos X y se les determinaron los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* del gen VDR, sin embargo no se encontró asociación entre ninguno de los polimorfismos analizados y la DMO (Jaramillo-Rangel *et al.*, 1999).

5.6. La cafeína como factor de riesgo de osteoporosis

Además del factor genético, existen otros factores asociados a la osteoporosis tales como el estilo de vida y la dieta donde se relaciona al consumo del calcio, de la vitamina D o de la cafeína con la DMO y la etiopatogenia de esta enfermedad.

La cafeína es la droga psicoactiva más usada en el mundo, se encuentra en fuentes dietéticas como el café, té, chocolate, refrescos, etc. (Winston *et al.*, 2005). Este compuesto induce a un balance negativo de calcio debido a que incrementa su pérdida urinaria evitando que se reabsorba adecuadamente. Este

efecto fue establecido desde hace décadas y se observó que la absorción incorrecta del calcio es más pronunciada cuando se consumen bajas cantidades de este mineral en la dieta (Massey y Whiting, 1993), aunado a este efecto de aceleración de la excreción de calcio por orina, se ha sugerido que las dosis elevadas de cafeína disminuyen la expresión de la proteína VDR que afecta la función de los osteoblastos mediante una reducción en la viabilidad de estas células; además, se sugiere que esta droga puede incrementar la tasa de apoptosis de los osteoblastos lo cual disminuye la remodelación ósea (Rapuri *et al.*, 2007; Tsuang *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el consumo de cafeína menor a 500 mg/día no causa deshidratación o desequilibrio crónico de agua ya que el contenido de líquido de la bebida con estas cantidades de cafeína tiende a compensar el efecto diurético agudo (Armstrong *et al.*, 2005).

Dosis pequeñas de cafeína, como las que se encuentran comúnmente en bebidas, tienen poca o ninguna acción diurética pero dosis mayores (>250 mg/día) sí producen esta acción, promoviendo con esto la excreción acelerada del calcio y en consecuencia la disminución de la masa ósea (Maughan y Griffin, 2003).

La exposición a un factor dietético inhibidor de la absorción del calcio trae como consecuencia una acelerada pérdida de la DMO, que con el tiempo y otros factores puede favorecer a la aparición de la osteoporosis (Rapuri *et al.*, 2001). Además de los efectos del consumo de cafeína, en la población mexicana, se ha reportado que la ingesta de calcio es mucho menor a las recomendaciones internacionales, lo cual deja espacio para un efecto mayor de la cafeína sobre la absorción del calcio y por ende una menor DMO (Clark *et al.*, 1998).

Para determinar la cantidad de cafeína que consume diariamente un individuo se utilizan cuestionarios de consumo. Estos cuestionarios se pueden llenar de manera retrospectiva por medio de entrevistas, donde el sujeto indica

su consumo pasado o típico de bebidas que contengan cafeína, o con diarios prospectivos, en donde el paciente va registrando su consumo conforme va ocurriendo. Un estudio reciente correlacionó el consumo de cafeína con la masa ósea en mujeres jóvenes y con el uso del anticonceptivo hormonal acetato de medroxiprogesterona proponiendo como instrumento una frecuencia de consumo de cafeína que enlista una serie de bebidas con contenido alto de cafeína y ciertos medicamentos que contienen esta sustancia y el paciente responde en qué cantidad y con qué frecuencia utiliza esa bebida y/o medicamento. En el estudio encontraron que el consumo de cafeína en grandes cantidades se asocia con la disminución del contenido mineral óseo en mujeres que usaban como método anticonceptivo el acetato de medroxiprogesterona (Wetmore *et al.*, 2008).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes marcas comerciales:

Marca comercial	Reactivos
Bio-Rad	Agarosa, Bromuro de etidio, NaCl, SDS, Tris, EDTA.
Bioline	<i>Taq</i> Polimerasa, dNTPs, MgCl ₂ , buffer 10X, Marcadores de talla molecular HyperLadder IV y V.
USBiological	Enzima de restricción <i>TaqI</i> .
Research organics	Fenol, Triton X100.
CTR Scientific	Cloroformo, NaOH, Ácido acético glacial.
Bio Basic Inc.	Etanol.
Alpha DNA	Oligonucleótidos.

6.2. Métodos

6.2.1. Diseño del estudio

El estudio fue transversal y descriptivo ya que las variables se midieron una sola vez y no se intentó modificar alguna de ellas por procedimientos externos. Se realizó de agosto de 2010 a agosto de 2011.

Las unidades de observación fueron mujeres jóvenes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: entre 19 y 29 años de edad, estudiantes de la

Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL, aparentemente saludables, con un IMC de 19-24.9kg/m², sin enfermedades diagnosticadas que pudieran alterar la absorción del calcio, que no consumieran ningún suplemento de este micronutriente, sin hijos, sin abortos, que no estuviesen embarazadas. No participaron las mujeres que no cumplieron con estos criterios y las que reportaron una práctica deportiva de alto rendimiento.

Para calcular el tamaño de la muestra de estudio se tomó en consideración que la población femenina estudiantil, durante el semestre agosto-diciembre del 2010, era de 894 estudiantes y se aplicó la siguiente fórmula (Milton y Tsokos 2001):

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde N es el total de la población, $Z_{\alpha}^2 = 1.96$ (con la confiabilidad del 95%), p es la proporción esperada (en este caso 5% = 0.05) q equivale a $1-p$ (en este caso $1 - 0.05 = 0.95$), d es la precisión (3%).

$$n = \frac{894 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.03^2 (894 - 1) + 3.84 * 0.05 * 0.95}$$

Con la ecuación anterior se obtuvo un tamaño de muestra de 112, sin embargo se reclutó a 160 mujeres para prevenir casos de abandono del estudio, considerando además, que el genotipo tt del polimorfismo del gen en estudio se encuentra presente en un pequeño porcentaje de la población.

A la población estudiantil se le invitó a participar en el estudio mediante carteles informativos colocados en los edificios de la facultad y con un módulo en el edificio central. A las interesadas se les proporcionó información detallada sobre el objetivo general del estudio, las seleccionadas firmaron su carta de consentimiento informado (anexo A) para participar en el estudio.

La parte experimental de este trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Laboratorio de Composición Corporal y Laboratorio de Gasto Energético.

6.2.2. Estrategia general.

Para lograr los objetivos propuestos se diseñó la estrategia que se presenta en la figura 3. A las participantes se les determinó la densidad mineral ósea de cuerpo total y dual de fémur, el análisis del polimorfismo del gen VDR y se identificó el consumo diario de cafeína.

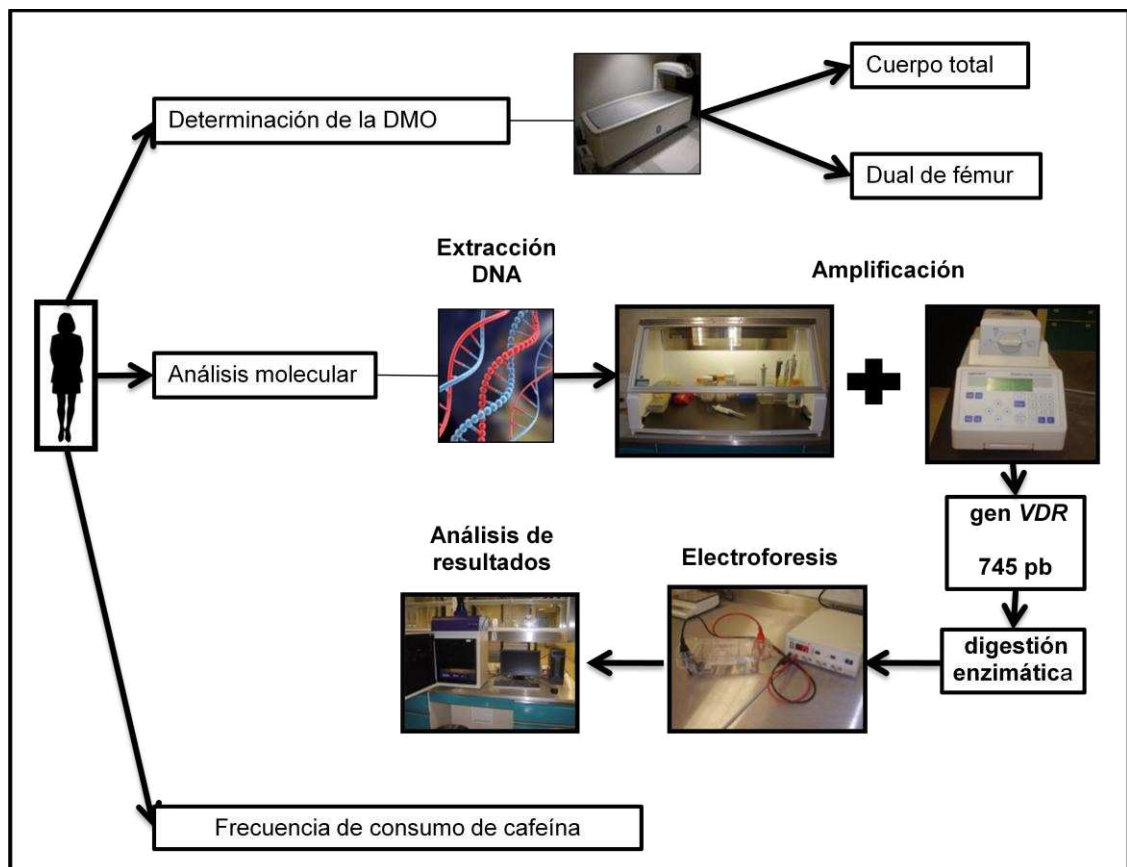


Figura 3.- Estrategia general de trabajo para la investigación

6.2.3. Obtención de la información.

6.2.3.1. Densitometría ósea.

Para evaluar la densidad mineral ósea se utilizó el método de absorciometría dual de rayos X (DXA). La densidad ósea se tomó en dual de fémur (DMOdf) y cuerpo completo (DMOt) con el densitómetro DXA Lunar PRODIGY Advance 301264 de la marca General Electric; se siguieron las instrucciones del fabricante que concuerdan con las posiciones oficiales de la sociedad internacional de densitometría clínica (Leib *et al.*, 2004). A las participantes se les pidió que se presentaran con al menos tres horas sin consumir alimentos y que no portaran joyería al momento de la evaluación. Para determinar la DMOt, se pidió a cada una de las mujeres que se acostaran en la plancha viendo al frente y situadas a 3 cm de la línea superior marcada en el equipo, se ubicaron de acuerdo a las estipulaciones del fabricante, sujetándoles piernas y tobillos con cinta ajustable; posterior a esto se realizó el escaneo del cuerpo. En caso de haber algún error en la medición, el propio aparato lo reportaba y se hacía nuevamente la determinación. Al hacer esta medición el DXA proporciona otras medidas como el peso, talla y porcentaje de grasa corporal, los cuales se tomaron en cuenta para hacer los análisis comparativos de masa ósea y medidas antropométricas.

La determinación de la DMOdf se realizó en la misma sesión; se dejó a la paciente acostada en la plancha y se le pidió que separara ligeramente las piernas y las colocara al lado de un aditamento del equipo en forma de trapecio que brinda soporte a los pies para la correcta posición, las manos se colocaron a la altura del pecho en forma de cruz y el escáner se situó a 3 centímetros de la sínfisis púbica y justo en la mitad de la pierna.

Además de la medida de la DMO (en g/cm^2) se obtuvieron también los niveles de T-Score, que representa la diferencia entre la DMO medida y el valor promedio de una mujer joven expresado en desviaciones estándar (DE) para una población normal. Este valor se utilizó para hacer un diagnóstico del estado de las jóvenes del estudio de acuerdo a los criterios propuestos por la OMS para el diagnóstico de osteopenia (tabla I).

6.2.3.2. Polimorfismo *TaqI* del gen VDR.

La determinación del polimorfismo *TaqI* del gen VDR se realizó siguiendo el protocolo utilizado por Quevedo y colaboradores en el año 2008. La técnica se dividió en las siguientes secciones:

- 1.- Obtención del DNA genómico, por el método de buffer de lisis TSNT, a partir de sangre sin coagular.
- 2.- Amplificación de una región de 745 pb del gen del receptor de la vitamina D (en el exón 9) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por las siglas en inglés).
- 3.- Detección de los fragmentos de restricción (RFLP, polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción) de los productos amplificados por medio de la digestión del producto de PCR con la enzima *TaqI*.
- 4.- Identificación del patrón de alelos de cada una de las muestras por medio de electroforesis en geles de agarosa, de los productos obtenidos de la digestión enzimática.

6.2.3.2.1. Extracción de DNA con el método de buffer de lisis TSNT

A las participantes se les pidió que se presentaran con 8 horas de ayuno y se les realizó una extracción de tres mL de sangre periférica mediante punción venosa; la sangre se depositó en tubos con el anticoagulante EDTA. Para la extracción del DNA se utilizó el método del buffer de lisis TSNT (Sambrook y Russell, 2001) como se describe brevemente: en un tubo de polipropileno de 1.5 mL se colocaron 300 μ l de sangre y se añadieron 300 μ l de buffer de lisis TSNT; se mezcló completamente por inversión y se agregaron 200 μ l de fenol; nuevamente se mezcló por inversión 5 veces, se agregaron 100 μ l de cloroformo y se agitó en vortex (Marca Genie 2, modelo G560 Daigger) fuertemente durante 1 min. Después se añadieron 150 μ l de buffer TE, se mezcló por inversión y se centrifugó por 11 min a 13,200 rpm en una microcentrífuga (marca eppendorf, modelo 5415 D). Al terminar este paso, el sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un tubo nuevo, se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 6 min, al sobrenadante que resultó de este paso se le transfirió a otro tubo y se agregó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C por 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,200 rpm por 11 min, el sobrenadante se eliminó por decantación (por el lado donde no estuviera la pastilla de DNA), y al tubo se le agregaron 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó por 6 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente; el DNA obtenido se resuspendió en agua agregando 100 μ l de agua ultra pura y se almacenó a -20°C.

6.2.3.2.2. Electroforesis en geles de agarosa.

Para determinar la calidad y cantidad del DNA extraído se utilizaron geles de agarosa al 1%; para el producto amplificado por PCR, al 2% y para la determinación del genotipo en base a los productos de la digestión enzimática se utilizaron geles al 3.5%.

Los geles para electroforesis se prepararon de la siguiente manera: la agarosa se pesó y se depositó en un matraz, se agregó buffer TAE 1X en las cantidades adecuadas, se calentó en la placa de calentamiento (marca Corning, Stirrer/hot plate) hasta que el líquido fue homogéneo, se vertió el contenido del matraz en un tubo de polipropileno de 50 mL y se agregó 1 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), se mezcló el contenido por inversión, se vació en el molde, se le colocó el peine y se le permitió gelificar.

Cuando el gel estuvo listo se colocó con el molde en una cámara de electroforesis (marca Bio-rad, modelo minisub cell GT) y se cubrió con buffer TAE 1X. Para estimar la talla molecular del DNA analizado, se utilizaron diferentes marcadores de pares de bases (pb); se colocaron 2 μ l del marcador necesario (HyperLadder IV para productos de PCR de 100 a 1000 pb e HyperLadder V para productos digeridos de 25 a 500 pb) y en los carriles siguientes la cantidad necesaria de DNA genómico (2 μ l), producto de PCR (15 μ l) o productos de PCR digeridos (15 μ l); la electroforesis se llevó a cabo (en todos los casos) aplicando un voltaje de 20 V durante 5 min, seguido de 80 V durante 40 min con una fuente de poder (marca Bio-Rad, modelo Power pac 300).

6.2.3.2.3. Amplificación de DNA genómico

Para la amplificación mediante PCR del segmento de interés, se utilizó como templado el DNA de cada una de las muestras; se realizó una amplificación de un segmento de 745 pb del gen VDR utilizando los oligonucleótidos 5' CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG 3' y 5' GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA 3'

previamente descritos por Quevedo y colaboradores en el 2008 y con los componentes (y cantidades de cada uno de ellos) necesarios para una reacción típica de PCR (ver tabla II). En cada una de las muestras, la cantidad de DNA se ajustó para agregar un volumen de 5 μl a cada tubo de reacción y que finalizara con un volumen total de 25 μl .

Tabla II
Componentes para la amplificación por PCR

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Agua ultra pura	13	-----
MgCl ₂ 50 mM	1.5	3 mM
Oligo. sentido 10 pm/ μl	1	0.4 pm/ μl
Oligo. antisentido 10 pm/ μl	1	0.4 pm/ μl
Buffer PCR 10X	2.5	1X
DNTPs 2.5 mM c/base	0.5	0.5 mM
Taq Polimerasa 1 U/ μl	0.5	0.02 U/ μl
DNA	5.0	
Volumen final	25	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador (marca Eppendorf, mastercycler personal) bajo las condiciones descritas en la tabla III.

Tabla III
Condiciones de PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Evento
1	94	300	Desnaturalización
2	94	40	Desnaturalización
3	60	40	Apareamiento
4	72	40	Extensión
5	30 ciclos al paso 2		
6	72	420	Extensión

El producto resultante de la amplificación se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, en las condiciones descritas anteriormente.

6.2.3.2.4. Digestión enzimática del segmento amplificado

Con los segmentos amplificados por PCR se procedió a identificar el polimorfismo en base a la longitud de los fragmentos de restricción, mediante el uso de la enzima de restricción *TaqI*. En un tubo de polipropileno de 0.5 mL se colocaron 1.5 µl de buffer 10X específico para la enzima, 0.5 µl de la enzima *TaqI*, 6 µl de agua ultrapura y 7 µl del producto amplificado. Para la digestión, las muestras se incubaron a 65 °C durante 90 min. Para el análisis de los productos de digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3.5%.

6.2.4 Determinación del consumo de cafeína

Para determinar el consumo diario de cafeína de las participantes, se utilizó una encuesta de frecuencia de consumo (anexo B) que consiste en una encuesta modificada de la utilizada por Wetmore y cols. en el año 2008. La modificación consistió en eliminar de la lista original productos que no se venden en nuestra ciudad y se agregaron otros que se consumen comúnmente en la localidad. Para verificar la utilidad de dicha encuesta se realizó el siguiente procedimiento: a 10 mujeres que cumplían con los criterios de inclusión se les aplicaron 3 recordatorios de 24 horas (2 entre semana y uno en fin de semana) y los datos obtenidos de estos recordatorios se procesaron en el programa *food processor* (Fabricante: Esha Research, versión 7.6) con lo cual se obtuvo el consumo promedio diario de cafeína (mg/día). A las mismas mujeres se les tomó en la misma semana, una encuesta para identificar la frecuencia de consumo de cafeína, con la cual se obtuvo un consumo diario de cafeína expresada en mg, ambos datos se compararon y se verificó mediante una prueba de Pearson ($p = 0.86$) la similitud en ambas encuestas para evaluar el consumo de cafeína que realizan las mujeres jóvenes con características iguales a las del estudio.

Una vez que la encuesta modificada fue verificada, las encuestas de frecuencia de consumo fueron aplicadas de manera individual a cada una de las participantes por un grupo de licenciadas en nutrición con la finalidad de asegurar una correcta expresión de las cantidades ingeridas de la bebida. Este volumen, expresado en mL después se convirtió a mg/día, considerando el contenido de cafeína expresado en mg reportado por el productor por cada 100 ml de la bebida consumida.

Los valores de consumo de cafeína de cada participante fueron clasificados como “bajo” o “alto” si el consumo era menor o mayor de 250 mg/día, respectivamente, según lo descrito por Maughan y Griffin (2003).

6.2.5 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó la estadística descriptiva correspondiente (media, desviación estándar, etc.). Se utilizó una prueba de regresión lineal para analizar la asociación de la DMOt y DMOdf con las medidas antropométricas, con el genotipo y con el consumo de cafeína. Para determinar la posible asociación entre la densidad mineral ósea, el polimorfismo *TaqI* del gen VDR y el consumo de cafeína, se utilizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Todos los análisis estadísticos se hicieron con un nivel de confiabilidad del 95% utilizando el programa SPSS versión 15.0.

7.- RESULTADOS

En el proceso se reclutó a 161 mujeres estudiantes que cumplían los criterios de inclusión, sin embargo, once de ellas no concluyeron sus mediciones debido a que a dos de ellas no se les pudo extraer sangre y nueve no asistieron a la medición de la densidad mineral ósea; finalmente sólo se tomaron en cuenta los datos de 150 participantes.

7.1. Características generales del grupo estudiado

La edad promedio de las participantes fue de 21 ± 1.84 años, tuvieron un peso promedio de 53.6 ± 6.07 kg, la talla promedio fue de 160.6 ± 5.6 cm, el índice de masa corporal (IMC) de 20.7 ± 1.7 kg/m². El porcentaje de grasa corporal total obtenido con el DXA fue de 34.6 ± 5.6 % (tabla IV).

Tabla IV
Características generales del grupo de estudio

Características	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio \pm DE
Edad (años)	19	29	21.08 ± 1.84
Talla (cm)	148.0	175.2	160.6 ± 5.62
Peso (kg)	41.2	74.3	53.59 ± 6.07
IMC (kg/m ²)	19	24.9	20.75 ± 1.79
Grasa corporal (%)	19	49	34.59 ± 5.61

n=150

7.2. Determinación de la densidad mineral ósea

En la tabla V se muestra que el promedio de la DMOt fue de 1.096 ± 0.064 g/cm² y el promedio de la DMOdf fue de 0.960 ± 0.107 g/cm². Además se detallan las DMO de diversas regiones anatómicas.

Tabla V
Densidad mineral ósea (g/cm²) en diferentes regiones anatómicas del grupo de estudio.

Región	mínimo	máximo	Promedio \pm DE
Pelvis	0.695	1.302	1.066 ± 0.098
Columna	0.825	1.317	1.008 ± 0.086
Cuello femoral	0.757	1.307	1.003 ± 0.114
Triángulo de Wards	0.645	1.248	0.913 ± 0.127
Trocánter	0.550	1.066	0.774 ± 0.108
Diáfisis	0.847	1.466	1.159 ± 0.130
DMOdf	0.689	1.269	0.960 ± 0.107
DMOt	0.969	1.259	1.096 ± 0.064

n=150

7.3. Análisis del polimorfismo *TaqI* del gen VDR

La calidad del DNA extraído con buffer de lisis TSNT se corroboró por electroforesis en geles de agarosa al 1%, bajo las condiciones descritas en metodología. En todas las muestras se observó que la calidad del DNA extraído era adecuada para utilizarla en los ensayos de amplificación por PCR. Como se puede ver en la figura 4 no se observaron bandas o “corrimientos” que indicaran degradación del DNA obtenido.

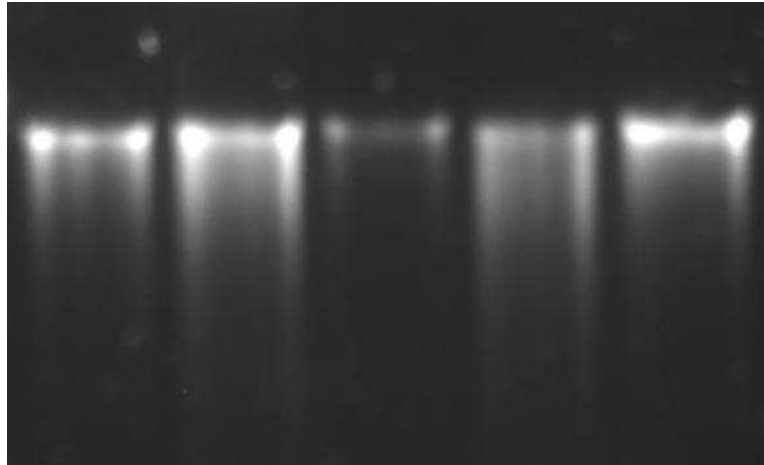


Figura 4.- DNA extraído a partir de sangre periférica. Se presenta una muestra representativa del DNA extraído cuya integridad fue comprobada por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Los productos de la amplificación por PCR del fragmento de 745 pb del gen VDR se observaron en geles de agarosa al 2%. En la figura 5 se observan algunos de los productos amplificados mencionados, así como los controles requeridos. Los productos amplificados tienen el tamaño correspondiente (745 pb) conforme a lo esperado.

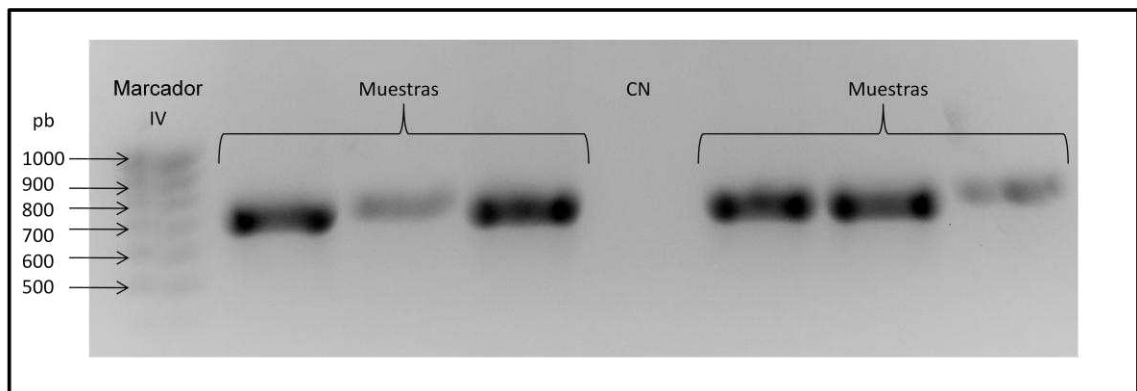


Figura 5.- Productos de la amplificación por PCR de un fragmento del gen VDR. El marcador de talla molecular HyperLadder IV en el primer carril marca el tamaño de los productos amplificados (745 pb aproximadamente). Se incluyen 6 muestras representativas, así como el control negativo (CN).

Una vez corroborada la amplificación de los fragmentos del gen VDR los productos amplificados se sometieron a una digestión con la enzima *TaqI* a 65 °C por 90 min, con lo cual se obtuvieron los genotipos de este SNP para cada una de las participantes. En la figura 6 se puede observar la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado por PCR (745 pb) y el esquema de los fragmentos esperados para cada genotipo.

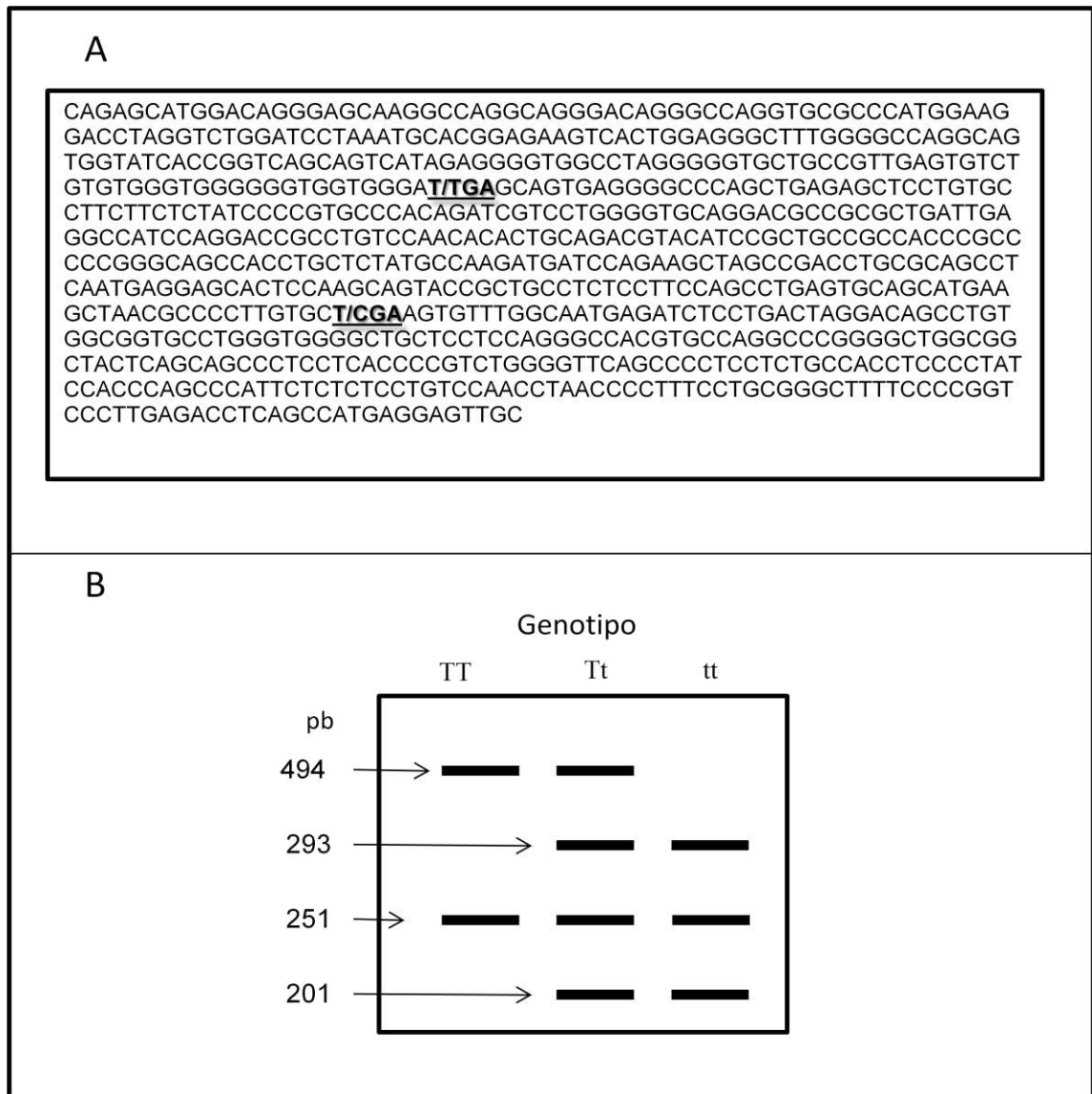


Figura 6.- A. Secuencia nucleotídica del fragmento de 745 pb del gen VDR. Destacan los sitios TCGA que reconoce la enzima *TaqI*. B. Representación gráfica de los fragmentos esperados por genotipo. Se muestra al genotipo TT con un solo sitio TCGA representado por dos bandas de 494 y 251 pb, el genotipo tt en donde se crea otro sitio TCGA que la enzima reconoce y corta dando como resultado tres bandas de 293, 251 y 201 pb y el genotipo heterocigoto Tt que se caracteriza por cuatro bandas de 494, 293, 251 y 201 pb.

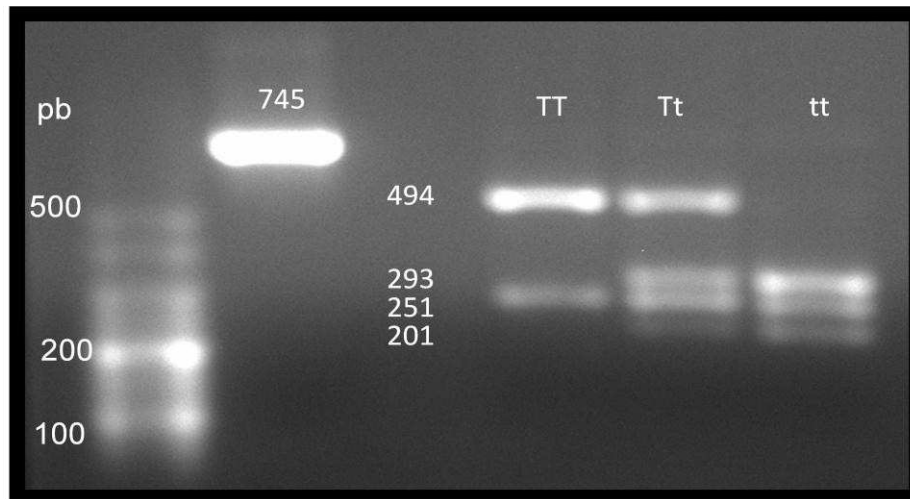


Figura 7.- Productos de digestión del polimorfismo *TaqI* del gen VDR. Se observa además de los productos de digestión el fragmento amplificado de 745 pb.

Con los resultados obtenidos por la técnica de PCR-RFLP se determinó la frecuencia de los genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen VDR encontrados en este estudio. En la tabla VI se observa que el genotipo más frecuente fue TT (56.7%), en cambio el genotipo menos frecuente fue el tt (6%). El alelo más frecuente en esta población fue el T (75%). La distribución de los porcentajes de los genotipos de la muestra analizada cumplió con el equilibrio de Hardy Weinberg ($p = 0.753$).

Tabla VI

Frecuencia de genotipos y alelos del polimorfismo *TaqI* del gen VDR

	TT	Tt	tt
<i>TaqI</i> *	85 (56.7)	56 (37.3)	9 (6)
Alelos (%)	T (75)		t (25)

* representa al polimorfismo *TaqI* del gen VDR

Entre paréntesis se indica el porcentaje correspondiente a cada genotipo.

7.4. Determinación del consumo de cafeína.

Cuando se aplicó el cuestionario de consumo de cafeína a las 150 participantes en el estudio, se encontró que el promedio de cafeína ingerida fue de 49.07 ± 91.53 mg/día con un valor mínimo de 0 y un máximo de 506 mg/día. Con los datos del consumo reportado por cada una de las integrantes del estudio se hizo una división en dos grupos: uno de consumo alto para quienes consumían más de 250 mg/día y otro de consumo bajo de cafeína (<250 mg/día). Como resultado de lo anterior se pudo observar que 141 mujeres (94%) tenían un consumo bajo de cafeína, mientras que solo 9 (6%) consumía más de 250 mg diarios de esta sustancia.

7.5. Asociación de la DMO con factores antropométricos

Para analizar la relación entre la DMO con los factores antropométricos, se utilizó un análisis de regresión lineal simple. Los resultados mostraron una asociación positiva de la DMOt con el IMC, la talla y el peso; por ejemplo, el valor de β encontrado con la DMOt y el IMC indica que la densidad mineral ósea se incrementa en 0.012 g/cm^2 por cada unidad de IMC. En cambio, no se encontró asociación de la DMOt con la edad ni el porcentaje de grasa corporal (tabla VII).

Tabla VII
Asociación de la DMOt con diferentes factores

	r^2	$\beta \pm ES$	p
IMC	0.079	0.012 \pm 0.003	0.001*
Edad	0.003	0.002 \pm 0.003	0.541
Talla	0.057	0.003 \pm 0.001	0.003*
Peso	0.143	0.004 \pm 0.001	0.000*
Porcentaje de grasa corporal	0.001	0.004 \pm 0.001	0.757

*Diferencia significativa ($p < 0.05$)

En el análisis de la asociación de la DMOdf con los factores antropométricos se encontró una relación positiva con el IMC, talla y peso; se observó una asociación negativa con la edad (tabla VIII).

Tabla VIII
Asociación de la DMOdf con diferentes factores

	r^2	$\beta \pm ES$	p
IMC	0.039	0.014 \pm 0.006	0.016*
Talla	0.038	0.004 \pm 0.002	0.018*
Peso	0.080	0.005 \pm 0.001	0.000*
Edad	0.062	- 0.014 \pm 0.005	0.002*
Porcentaje de grasa corporal	0.002	-0.007 \pm 0.002	0.604

*Diferencia significativa ($p < 0.05$)

7.6. Asociación de la densidad mineral ósea con el polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y con el consumo de cafeína

La asociación de la DMO con los genotipos del polimorfismo *TaqI* y el consumo diario de cafeína, se analizó mediante el análisis de regresión lineal simple y la prueba de ANOVA. Al utilizar la prueba de regresión lineal no se encontró asociación entre la DMOt o DMOdf con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR, pero sí de la DMOdf con el consumo de cafeína (tabla IX).

Tabla IX
Asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR y con el consumo diario de cafeína utilizando la prueba de regresión lineal simple

	r^2	$\beta \pm ES$	p
DMOt con genotipo	0.000	0.000 ± 0.009	0.989
DMOdf con genotipo	0.001	0.006 ± 0.014	0.698
DMOt con cafeína	0.016	8.890 ± 0.000	0.123
DMOdf con cafeína	0.037	0.000 ± 0.000	0.019*

*Diferencia significativa ($p < 0.05$)

Al analizar la asociación de los valores de DMO de las diferentes regiones óseas (pelvis, columna, etc.) con los genotipos del polimorfismo *TaqI* utilizando la prueba de ANOVA no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones analizadas con los genotipos (tabla X); lo cual significa que los promedios de las DMO de las regiones anatómicas analizadas son similares entre los diferentes genotipos.

Tabla X
Asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR utilizando la prueba de ANOVA.

Sitio	Genotipo	Media \pm DE	F	<i>p</i>
DMOt	TT	1.094 \pm 0.065	0.761	0.469
	Tt	1.103 \pm 0.065		
	tt	1.076 \pm 0.045		
DMOdf	TT	0.957 \pm 0.109	0.095	0.910
	Tt	0.961 \pm 0.108		
	tt	0.973 \pm 0.078		
Pelvis	TT	1.064 \pm 0.103	0.498	0.609
	Tt	1.073 \pm 0.095		
	tt	1.040 \pm 0.051		
Columna	TT	1.005 \pm 0.091	0.944	0.391
	Tt	1.017 \pm 0.084		
	tt	0.976 \pm 0.050		
Cuello femoral	TT	1.000 \pm 0.119	0.080	0.923
	Tt	1.008 \pm 0.109		
	tt	0.998 \pm 0.108		
Triángulo de Wards	TT	0.908 \pm 0.131	0.288	0.750
	Tt	0.923 \pm 0.119		
	tt	0.900 \pm 0.142		
Trocánter	TT	0.773 \pm 0.110	0.072	0.931
	Tt	0.777 \pm 0.103		
	tt	0.764 \pm 0.125		
Diáfisis	TT	1.153 \pm 0.133	0.289	0.749
	Tt	1.170 \pm 0.129		
	tt	1.154 \pm 0.116		

(*n* por genotipo TT = 85, Tt = 56, tt = 9)

La posible asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR según el consumo de cafeína, se analizó por medio de un análisis de regresión lineal simple y un análisis de varianza (ANOVA) dividiendo al grupo en mujeres con alto y bajo consumo de cafeína considerando el punto de corte en 250 mg/día. Los resultados se muestran en las tablas XI y XII. En ninguno de los análisis se encontró asociación entre la DMOt ó DMOdf con los genotipos analizados.

Tabla XI
Asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR según el nivel de consumo de cafeína utilizando la prueba de regresión lineal simple.

	Consumo de cafeína			
	Bajo (<250 mg/día)		Alto (>250 mg/día)	
	$\beta \pm ES$	p	$\beta \pm ES$	p
DMOt con genotipo	0.005 \pm 0.009	0.573	0.048 \pm 0.031	0.161
DMOdf con genotipo	0.002 \pm 0.015	0.892	0.066 \pm 0.043	0.168

Tabla XII
Asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR según los niveles de consumo de cafeína utilizando la prueba de ANOVA

	Consumo de Cafeína							
	Bajo (<250 mg/día)				Alto (>250 mg/día)			
	Genotipo (n)	Media \pm DE	F	p	Genotipo (n)	Media \pm DE	F	p
DMOt	TT (82)	1.095 \pm 0.066	0.914	0.403	TT (3)	1.081 \pm 0.045	1.277	0.345
	Tt (51)	1.098 \pm 0.064			Tt (5)	1.147 \pm 0.053		
	Tt (8)	1.066 \pm 0.035			Tt (1)	1.162 \pm 0.066		
DMOdf	TT (82)	0.957 \pm 0.110	0.025	0.975	TT (3)	0.973 \pm 0.108	1.017	0.416
	Tt (51)	0.953 \pm 0.107			Tt (5)	1.043 \pm 0.054		
	Tt (8)	0.957 \pm 0.066			Tt (1)	1.102 \pm 0.053		

8.- DISCUSIÓN

La osteoporosis es una enfermedad que afecta la resorción ósea y se caracteriza por una baja densidad mineral ósea y un deterioro de su microarquitectura lo que tiene como consecuencia una mayor fragilidad ósea y un aumento del riesgo de fracturas (WHO, 2003). Esta enfermedad es un grave problema de salud pública y se estima que un 17% de la población mexicana la padece. Por lo general, el diagnóstico de la osteoporosis se realiza hasta que se presenta la primera fractura (De Lago-Acosta, 2008). Se sugiere que las alteraciones degenerativas propias de la osteoporosis son frecuentes incluso en personas jóvenes. Por otra parte, diversos estudios respaldan que esta enfermedad es de origen multifactorial e involucra un fuerte componente genético. Esto, aunado a que la población mexicana tiene un número creciente de ancianos y que la esperanza de vida va en aumento, hacen necesaria la realización de numerosos estudios encaminados a analizar los componentes genéticos y ambientales que pudieran originar este padecimiento. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la posible asociación entre la densidad mineral ósea con los diversos genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen del receptor de la vitamina D y con el consumo de cafeína en mujeres jóvenes de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los valores de DMOdf encontrados en este estudio fueron similares a los publicados por Lazcano-Ponce (2003) en mujeres mexicanas entre 17 y 24 años de edad del centro del país. Estos valores de fueron ligeramente mayores que los encontrados en esa población, y es catalogada como normal pues los valores de DMOdf (0.950-1.189 g/cm²) se encuentran en el rango de T-Score de -1 a 1 DE, en cambio, los valores reportados para el centro del país caen en la categoría de osteopenia (Tamayo *et al.*, 2009). Valores de DMOdf determinados en otros estudios se muestran en la tabla XIII y se puede observar que son inferiores a los reportados en este estudio, sin embargo, se

debe señalar que para hacer las comparaciones es necesario considerar que las poblaciones tienen características diferentes principalmente con respecto a la edad y la etnia. Los valores de DMOt encontrados en este trabajo son semejantes a los publicados por Liang y cols. (2007) en los diferentes grupos étnicos analizados y son superiores a los descritos por Lazcano-Ponce en mujeres mexicanas del centro del país. Se sugiere profundizar en los estudios que determinen la DMO de la población del norte del país para compararlas con los del centro.

Tabla XIII
Densidad mineral ósea de diversas poblaciones

Referencia	Grupo de estudio	Población	DMOt (g/cm ²) Media ± DE	DMOdf (g/cm ²) Media ± DE
Nuestro estudio*	Mujeres de 19-30 años	Mexicana	1.096 ± 0.064	0.960 ± 0.107
Vupputuri <i>et al.</i> , 2006	Hombres y mujeres de promedio 43 años	Asiática		0.839 ± 0.112
Lazcano-Ponce <i>et al.</i> , 2003 *	Mexicanas de 17-24 años	Mexicana	0.960 ± 0.004	0.916 ± 0.108
Garnero <i>et al.</i> , 2005	Mujeres caucásicas de 31 a 89 años	Francesa		0.811 ± 0.122
Rapuri <i>et al.</i> , 2001	Ancianas de 65 a 75 años	Americana	1.003 ± 0.008	0.813 ± 0.010
Liang <i>et al.</i> , 2007 *	Mujeres de 20-35 años	Caucásica	1.098 ± 0.075	
		Hispana	1.115 ± 0.088	
		Asiática	1.068 ± 0.065	

*Estudios realizados en mujeres jóvenes

Los valores promedio de la DMOdf determinados en nuestro estudio son mayores a los publicados para poblaciones estudiadas en Asia, Francia y Estados Unidos, sin embargo, cabe señalar que en esos estudios se reclutaron mujeres premenopáusicas o postmenopáusicas (Vupputuri *et al.*, 2006; Garnero *et al.*, 2005; Rapuri *et al.*, 2001) por lo que el establecimiento de las comparaciones entre estas poblaciones se debe realizar con cautela, considerando estas diferencias entre las poblaciones analizadas.

Para comparar nuestros resultados con los descritos en otros estudios con respecto al genotipo del polimorfismo *TaqI* del gen VDR, se realizó un análisis estadístico de Ji-cuadrada, los resultados se muestran en la tabla XIV. La distribución encontrada fue similar (tanto de genotipo como de alelos) a la descrita por Jaramillo-Rangel y cols. (1999) quienes reportan el 55% de prevalencia del genotipo TT, pero difiere de los publicados por Quevedo en sus dos grupos de estudio donde se encuentran frecuencias de 29 y 39% del mismo genotipo (Quevedo *et al.*, 2008). Cabe señalar que en esos estudios se analizó a mujeres postmenopáusicas y/o con fracturas, por lo que es posible que haya un sesgo en los resultados obtenidos en esta comparación.

Tabla XIV

Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *TaqI* del gen VDR y las reportadas en diferentes estudios.

Referencias (n)	Características del grupo de estudio	Alelos (%)		Genotipos (%)			X ²
		T	t	TT	Tt	tt	
Este trabajo (150)	Mexicanas sanas 19-29 años	75	25	57	37	6	
Quevedo <i>et al.</i> , 2008 grupo control (59)	Chilenas de 65 -95 años	58	42	29	58	19	20.36*
Quevedo <i>et al.</i> , 2008 Grupo con fractura(67)	Chilenas de 65-95a con fractura diagnosticada	62	38	39	46	15	8.21*
Jaramillo-Rangel <i>et al.</i> , 1999 (98)	Mexicanas mayores de 25 años	76	24	55	42	3	1.35
Nguyen <i>et al.</i> , 2005 (677)	Caucásicas postmenopáusicas			36	49	15	2.56

*(p <0.05)

En cuanto al consumo de cafeína en la población, se encontró que la gran mayoría tienen un consumo menor a 250 mg/día, una posible explicación a lo anterior es que la población incluida era joven. Se determinó un consumo promedio de 49.7 mg/día, que resulta mucho menor al reportado en mujeres posmenopáusicas americanas que es de 229 mg/día (Ilich *et al.*, 2002) o al descrito por Maughan y Griffin en el 2003. En este último trabajo se sugiere que el consumo de cafeína en dosis mayores de 250 mg/día producen una acción diurética con lo cual se promueve la excreción acelerada de calcio y la disminución de la masa ósea. Al no alcanzar estos valores de cafeína se infiere que la población estudiada no tenía problemas con la excreción acelerada del calcio debido al bajo consumo de cafeína y por lo tanto la DMO no se vio afectada en esta población en ese rango de edad.

El análisis de nuestros resultados revela una asociación positiva entre los marcadores de riesgo de osteoporosis (peso y talla) y la DMO, así mismo se encontró que el IMC está asociado a una mayor densidad mineral ósea lo cual concuerda con lo encontrado por Padilla-Vázquez y cols. en el 2007, quienes observaron que el peso y la talla se asocian a la DMOdf. Además, se observó que la edad fue un factor determinante para la asociación de la DMOdf con peso y talla lo cual concuerda con lo reportado por Lazcano-Ponce y cols. en el 2003 quienes establecen que uno de los primeros sitios en donde se alcanza el pico de masa ósea es en el fémur, por lo que es en este sitio en el que se puede observar una asociación negativa entre la edad y la DMO. Por lo anterior, se considera que el peso y la talla son factores de atención para lograr una correcta adquisición de masa ósea en la juventud.

En este trabajo no se encontró asociación entre la DMO y el polimorfismo *TaqI* del gen VDR. La falta de asociación entre estas variables ya había sido reportada en otros estudios. En el año 2004, Morita y cols. estudiaron 1434 mujeres japonesas entre 15 y 79 años y no encontraron asociación entre la DMO y el polimorfismo *TaqI*. Resultados similares obtenidos con población mexicana, fueron publicados por Jaramillo-Rangel y cols. (1999) al analizar los mismos polimorfismos con diferentes partes del fémur proximal (trocánter, fémur y cuello) en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas de la ciudad de México. En una investigación realizada con mujeres caucásicas no se encontró asociación entre el polimorfismo *TaqI* con la DMO en ningún sitio esquelético incluyendo columna vertebral, cadera, antebrazo y cuerpo completo (Garnero *et al.*, 2005). Sin embargo, Rapuri y cols. (2001) reportaron que las personas con el genotipo *tt* tenían una tasa más alta de pérdida de DMO que aquellas que tenían el genotipo *TT*, lo cual era intensificado por el consumo de cafeína que tenían.

Por otra parte, algunas investigaciones analizan la asociación de los polimorfismos del gen VDR con riesgo de fractura (lo cual se puede considerar

como una determinación indirecta del grado de osteoporosis o consecuencia del mismo). En el año 2008, Quevedo y col. reportaron que en las mujeres chilenas de la región del Bio Bio no se observó asociación entre el polimorfismo *TaqI* y el riesgo de fractura. En cambio, Colin y cols. (2003) encontraron, en un estudio con 634 mujeres holandesas mayores de 55 años, que hay una interacción entre varios polimorfismos del gen VDR (*BsmI*, *Apal* y *TaqI*) y un incremento en el riesgo de fracturas vertebrales secundarias a la osteoporosis. En el 2005, Nguyen y colaboradores encontraron que el genotipo *tt* del polimorfismo *TaqI* se asoció con un incremento en el riesgo de fractura de cadera en mujeres postmenopáusicas australianas. En ese mismo año, Garner y cols. (2005) encontraron una fuerte asociación entre el polimorfismo *TaqI* y la incidencia de fracturas en mujeres postmenopáusicas francesas. Por lo anterior, es pertinente considerar como una necesidad la realización de estudios en México y específicamente en la zona norte del país en grupos de adultos mayores con y sin fracturas para determinar si el genotipo *tt* tiene alguna asociación con la DMO ó con la presencia de fracturas como consecuencia de la osteoporosis.

Al comparar a la DMO con el consumo de cafeína se encontró que en esta muestra el alto consumo de cafeína se asoció positivamente con la DMOdf, sin embargo, este resultado es más probable que se deba al bajo tamaño de la muestra de las personas con alto consumo de cafeína (9) que a un significado biológico de tal asociación ya que esto se contrapone a estudios previos que reportan el aumento de la tasa de pérdida de la DMO conforme el consumo de cafeína supera los 300 mg/día (Rapuri *et al.*, 2001). En un reciente se analizó el consumo de cafeína y se dividió a la población en metabolizadores rápidos y lentos de cafeína (lo cual se asociaba a la presencia o ausencia del gen que codifica para el receptor de la adenosina A_{2A} relacionado al metabolismo de esta sustancia) y concluyeron que la densidad mineral ósea fue menor en los que consumían altas cantidades de café y que tenían un metabolismo rápido de cafeína (Hallström *et al.*, 2010). Lo anterior indica que los efectos adversos de la cafeína se ven incrementados por factores genéticos que intervienen directamente en el metabolismo de esta sustancia. Posiblemente en nuestra

población no se pudo observar la asociación de la densidad mineral con el consumo de cafeína debido a que el consumo de cafeína fue bajo y solamente 9 mujeres fueron las que consumieron grandes cantidades de dicha sustancia, será importante considerar también para futuras investigaciones los resultados obtenidos por Hallström y cols.

Por último, para responder a la hipótesis inicial de este trabajo se realizó un análisis de asociación de la DMO con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR y considerando el consumo de cafeína en mujeres jóvenes. En tal análisis no se encontró asociación estadísticamente significativa utilizando las pruebas de regresión lineal simple o ANOVA. Estos resultados permiten sugerir que el consumo de cafeína no es un factor determinante en la no asociación entre la DMO y el polimorfismo analizado; sin embargo, esto se debe tomar con ciertas consideraciones. En primer lugar, el 94% de las participantes tuvieron un consumo bajo de cafeína (<250 mg diarios) y posiblemente el estudio deba reforzarse incrementando el tamaño de la muestra del grupo con mayor consumo de cafeína; en segundo lugar, en el estudio realizado por Rapuri y cols. (2001) se encontró que las mujeres postmenopáusicas con elevado consumo de cafeína y con el genotipo *tt* tienen una mayor pérdida de la DMO, sin embargo, las condiciones de las participantes en ese estudio (edad, estado postmenopáusico, etc.) son muy diferentes a las de este estudio. Por lo tanto, se sugiere considerar la realización de más estudios con mujeres postmenopáusicas para comprobar si en nuestra población se presenta también pérdida de DMO, y si ésta tiene relación con la presencia del genotipo *tt*. Por otra parte, algunos autores describen que el polimorfismo *TaqI* del gen VDR se asocia a una mayor fragilidad ósea por mecanismos independientes de la densidad mineral ósea (Michaelsson *et al.*, 2005, Morita *et al.*, 2004) y que por ende, los casos de fracturas por osteoporosis podrían deberse a daños en la microarquitectura que den indicios de fragilidad aun en la juventud pero que no son detectados como disminución en la DMO.

En general, podemos resumir que aunque con los datos obtenidos no se encontró asociación de la densidad mineral ósea con el polimorfismo *TaqI* del gen VDR ni con el consumo de cafeína, este estudio ofrece las ventajas de ser el primero en realizar un análisis de estas variables en una población joven de México, en aportar datos de prevalencia de los genotipos del polimorfismo *TaqI* del gen VDR y de consumo de cafeína en mujeres jóvenes del norte del país. Por lo tanto, los resultados de la presente investigación pueden servir para apoyar futuros estudios relacionados a cualquiera de estas variables. A partir de lo encontrado en este estudio se sugiere realizar más investigaciones relacionando a los otros polimorfismos del gen VDR u otros genes relacionados al metabolismo óseo y dar un seguimiento a la muestra de estudio para evaluar no solo la DMO sino la tasa de pérdida y observar el comportamiento de la DMO después de algunos años.

9.- CONCLUSIONES

En la presente investigación no se encontró asociación entre la densidad mineral ósea, el polimorfismo del gen VDR y el consumo de cafeína.

La determinación de los valores de la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes podrá ser utilizada para establecer el estado actual y determinar si es necesario tomar medidas preventivas para incrementar la DMO.

Es el primer informe sobre la densidad mineral ósea y la frecuencia del polimorfismo *TaqI* del gen VDR en mujeres jóvenes de Nuevo León.

El presente estudio servirá como referencia para estudios posteriores que relacionen a otro gen con la densidad mineral ósea y/o con el consumo de cafeína.

10.- LITERATURA CITADA

Andrew T, Antoniadou L, Scurrah KJ, MacGregor AJ, Spector TD. (2005). Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. *J Bone Miner Res.* 20(1): 67–74.

Armstrong LE, Pumerantz AC, Roti MW, Judelson DA, Watson G, Dias JC, Jokmen B, Casa DJ, Maresh CM, Lieberman H, Kellogg M. (2005). Fluid-electrolyte and renal indices of hydration during eleven days of controlled caffeine consumption. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 15:252-265.

Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. (1993). Osteoblastic cell lineage. Noda M editors. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. New York. Academic Press Inc. 1 - 45.

Barrett-Connor E, Chang JC, Edelstein SL. (1994). Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. *JAMA.* 271:280–283.

Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. (2005) Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci.* 102:3324–3329.

Binkley N, Kiebzak GM, Lewiecki EM, Krueger D, Gangnon RE, Miller PD, Shepherd JA, Drezner MK. (2005). Recalculation of the NHANES database SD improves T-Score agreement and reduces osteoporosis prevalence. *J Bone Miner Res.* 20(2): 195-201.

Blanco-Quirós A, Arranz-Sanz E, Garrote-Adrados JA. (2009). Luz solar, vitamina D y tuberculosis. *Bol Pediatr.* 49 (209): 220 - 226

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423:337-342.

Brown JP, Josse RG. (2002). For the Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of Canada. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Can Med Ass J.* 167:1-34.

Clark P, Carlos F, Barrera C, Guzmán J Maetzel A, Lavielle P, Ramirez E, Robinson V, Rodriguez-Cabrera R, Tamayo J, Tugwell P. (2008). Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos Int.* 19(3):269-276.

Clark P, Carlos F, Vázquez D. (2010). Epidemiología, costos y carga de la osteoporosis en México. *Rev Metab Óseo y Min.* 8(5):152-161.

Clark P, De la Peña F, Gómez-García F, Orozco JA, Tugwell P. (1998). Risk factors for osteoporotic hip fractures in Mexicans. *Arch Med Res.* 29(3):253-257.

Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. (2009). The impact of methods for estimating bone health and the global burden of bone disease. *Salud Pública Mex.* 51(1):38-45.

Colin EM, Uitterlinden AG, Meurs JB, Bergink AP, Van de Klift M, Fang Y, Arp PP, Hofman A, VanLeeuwen JP, Pols HA. (2003). Interaction between vitamin D receptor genotype and estrogen receptor α genotype influences vertebral fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (8): 3777-3784.

Cummings SR. (2005) Bone Density Screening: A New Level of Evidence?. *Ann Intern Med.* 142: 217-219.

Cusack S, Cashman KD. (2003). Impact of genetic variation on metabolic response of bone to diet. *Proc Nutr Soc.* 62:901 - 912.

De Lago-Acosta A, Parada-Tapia M, Somera-Iturbide J. (2008). Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México. *Ginecol Obstet Mex.* 76(5):261-266.

Eisman JA. (1999). Genetics of osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 20(6): 788- 804.

Fang Y, Van Meurs JB, D'Alesio A, Jhamai M, Zhao HY, Rivadeneira F, Hofman A, Van Leeuwen J, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. (2005). Promoter and 3'-UTR haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: The Rotterdam Study. *Am J Hum Genet*. 77:807-823.

Fernández-Tresguerres A, Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, Canto-Pingarron MD, Blanco-Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I: Histology and physiology of bone tissue. *Med oral patol oral cir bucal*. 11(1): 47-51.

Ferrari S, Chevalley T, Bonjour J, Rizzoli R. (2006). Childhood fractures are associated with decreased bone mass gain during puberty: an early marker of persistent bone fragility?. *J Bone Mineral Res*. 21(4): 501–507.

Ferrari S, Deutsch S, Antonarakis S. (2005). Pathogenic mutations and polymorphisms in the lipoprotein receptor-related protein 5 reveal a new biological pathway for the control of bone mass. *Curr Opin Lipidol*. 16(2):207-214.

Ferrari S. (2008). Human genetics of osteoporosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 22 (5) 723–735.

Funakoshi Y, Omari H, Katoh T. (2010). Relation of bone mineral density to vitamin D receptor gene polymorphism and lifestyle factors in japanese female workers aged 22 – 44 years: A cross sectional study. *J Nutr Sci Vitaminol*. 56(1): 27-33.

Gallagher JC, Sai AJ. (2010). Biología molecular de la remodelación ósea: implicaciones para los nuevos blancos terapéuticos de la osteoporosis. *Rev Metab Óseo y Min*. 8(2):60-71.

Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. (2005). Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4829-4835.

Glass DA, Karsenty G. (2007). *In vivo* analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology.* 148:2630–2634

Gómez-Alonso C, Naves-Díaz ML, Fernández-Martín JL, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB. (2001). Metabolismo óseo y polimorfismo del gen del receptor de la vitamina D. *Nefrología.* 21(1):45-50.

Hallström H, Melhus H, Glynn A, Lind L, Syvänen AC, Michaëlsson K. (2010). Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Nutrition & Metabolism.* 7:12.

Harris SS, Dawson-Hughes B. (1994). Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 60:573 - 578.

Hofbauer LC, Schoppet M. (2004). Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA.* 292:490-495.

Hustmyer FG, Liu G, Johnston CC, Christian J, Peacock M. (1999). Polymorphism at an Sp1 binding site of COL1A1 and bone mineral density in premenopausal female twins and elderly fracture patients. *Osteoporos Int.* 9(4):346-350.

Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. (2002). To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women?. *J Amer Coll Nutr.* 21(6): 536–544.

Jaramillo-Rangel G, Cerda-Flores RM, Cardenas-Ibarra L, Tamayo-Orozco J, Morrison N, Barrera-Saldaña HA. (1999). Vitamin D receptor polymorphisms and bone mineral density in mexican women without osteoporosis. *Am J of Human Biol.* 11(6):793 - 797.

Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R. (2008). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 19(4): 399 - 428.

Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, Burckhardt P, Cooper C, Christiansen C, Cummings S, Eisman JA, Fujiwara S, Glüer C, Goltzman D, Hans D, Krieg MA, La Croix A, McCloskey E, Mellstrom D, Melton LJ 3rd, Pols H, Reeve J, Sanders K, Schott AM, Silman A, Torgerson D, van Staa T, Watts NB, Yoshimura N. (2007). The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporosis Int.* 18(8): 1033–1046.

Karp G. (2005). *Biología celular y molecular conceptos y experimentos*, cuarta edición. México: Interamericana McGraw-Hill.

Kontulainen S, Sievänen H, Kannus P, Pasanen M, Vuori I. (2003). Effect of long-term impact-loading on Mass, Size, and Estimated Strength of Humerus and Radius of Female Racquet-Sports Players: A Peripheral Quantitative Computed Tomography Study Between Young and Old Starters and Controls. *J Bone Miner Res.* 18 (2): 352-359.

Langdahl BL, Ralston SH, Grant SF, Eriksen EF. (1998). An Sp1 binding site polymorphism in the COLIA1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J Bone Miner Res.* 13(9):1384–1389.

Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Cruz-Valdez A, Díaz R, Hernández B, Del Cueto R, Hernández-Ávila M. (2003). Peak bone mineral area density and determinants among females aged 9 to 24 years in Mexico. *Osteoporos Int.* 14: 539–547.

Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Díaz R, Burguete AI, Salmerón J. (2009). Correlation trends for bone mineral density in Mexican women: Evidence of familiar predisposition. *Salud Pública de Mex.* 51(1):93-99.

Leib ES, Lewiecki EM, Binkley N, Hamdy RC. (2004). Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densit.* 7(1):1-6.

Lian JB, Stein GS. (1992). Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev in Oral Biol and Med.* 3(3): 269-305.

Liang M, Bassin S, Dutto D, Braun W, Wong N, Pontello AM, Cooper DM, Arnaud SB. (2007). Bone mineral density and leg muscle strength in young caucasian, hispanic and asian women. *J Clin Densitom.* 10(2): 157–164.

Lidén M, Wilén B, Ljunghall S, Melhus H. (1998). Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I α 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden. *Calcif Tissue Int.* 63:293–295.

Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC Jr, Lindsay R. (1998) Updated data on proximal femur bone mineral levels of U.S. adults. *Osteoporos Int.* 8(5):468–489.

Massey LK, Whiting SJ. (1993). Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr.* 123, 1611–1614.

Matsuo K, Irie N. (2008). Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 473:201–209.

Maughan RJ, Griffin J. (2003). Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *J Hum Nutr Dietet.* 16: 411- 420.

Melton LJ. (2003). Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J Bone Miner Res.* 18(6):1139-41.

Michaelsson K, Melhus H, Ferm H, Atilbom A, Pedersen NL. (2005). Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch Int Med.* 165(16): 1825–1830.

Mikán V, Oliveros W. (2007). Osteoclastogénesis y Enfermedades óseas. *Rev Fac Med.* 15(2): 261–270.

Milton JS, Tsokos JO. (2001). Estadística para biología y ciencias de la salud. Madrid: Interamericana McGraw Hill.

Mitchell BD, Kammerer CM, Schneider JL, Perez R, Bauer RL. (2003). Genetic and environmental determinants of bone mineral density in Mexican Americans: results from the San Antonio Family. *Osteoporos Study Bone.* 33(5): 839-846.

Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H, Marumo F. (2004). Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese Women. The Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Int J Epidemiol.* 33:979–988.

Mundy D, Chen S, Oyajobi K. (2003). Bone remodeling, primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. En: Favus MJ, 5th ed. Washington. ASMBR. p. 46-56.

Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant SF, Center JR, Gardiner EM, Eisman JA. (2005). Contribution of the collagen I α 1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 6575-6579.

Padilla-Vázquez AV, Lamadrid-Figueroa H, Cruz-Valdez A. (2007). El peso, el porcentaje de grasa y la densidad mineral ósea materna son determinantes de la densidad mineral ósea en mujeres adolescentes y adultas jóvenes. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 64: 72-82.

Picotto G, Pérez A, Díaz de Barboza G, Talamoni NT. (2007). Genes candidatos asociados a la osteoporosis. *Actualiz Osteología*. 3(2): 90-95.

Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. (1987). Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest*. 80:706 - 710.

Quevedo LI, Martínez M, Castillo M, Rivera N. (2008). Polimorfismos del gen del receptor de vitamina D y riesgo de fractura de cadera en la mujer adulta mayor de la región del Bío Bío. *Rev Méd Chile*. 136: 475-481.

Rapuri P, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*. 74(5), 694 - 700.

Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z. (2007). Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25 (OH)₂D₃ stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J of Steroid Bioch and Mol Biol*. 103:368–371.

Richards JB, Fotini K, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Yi-Hsiang H, Zillikens MC, Wilson SG, Mullin BH, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Hofman A, Kong A, Karasik D, Van Meurs JB, Oostra BA, Pols HAP, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Soranzo N, Williams FMK, Zhou Y, Ralston SH, Thorleifsson G, Van Duijn CM, Kiel DP, Stefansson K, Uitterlinden AG, Ioannidis JPA, Tim D. (2009). Collaborative Meta-analysis: Associations of 150 Candidate Genes With Osteoporosis and Osteoporotic Fracture. *Ann Intern Med*. 151(8): 528 - 537.

Rosen C, Kurland ES, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. (1998). Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: Implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*. 83(7): 2286-2290.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffne S, Van Etten WJ, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D. (2000). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 409(6822): 928-933.

Sambrook J, Russell D. (2001). A molecular cloning manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri A, Sánchez A. (2007). Guías para diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis 2007. *Rev Arg de Osteo*. 6(3): 27-42.

Tamayo J, Díaz R, Lazcano-Ponce E, Muñoz M, Huitrón G, Halley E, Díaz-Montiel JC, Mudgal J, Hernández-Ávila M, Salmerón J. (2009). Reference values for areal bone mineral density among a healthy Mexican population. *Salud Pública de Mex*. 51(1) S56-S83.

Teitelbaum S. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289 (5484):1504-1508.

Terminé JD. (1993). Bone matrix proteins and mineralization process. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 2ª edición, Editorial Raven Press. New York, 21-24.

Tsuang HY, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. (2006). Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J of Orthopaedic Surg and Res*.1:7-14.

Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, Hofman A, Van Leeuwen JP, Pols HA, Ralston SH. (1998). Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 338:1016–1021.

Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinber D, Langdah BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amedei A, Bassiti A, Bustamante M, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, Van-Leeuwen JP, Mavilia C, Van-Meurs JB, Mangion J, Fiona, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, Van-Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP. (2006). The Association between Common Vitamin D Receptor Gene Variations and Osteoporosis: A Participant-Level Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine.* 145 (4): 255-264.

Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S. (2004). Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 22(4): 341-345.

Velasco-Murillo V, Navarrete-Hernández E, Pozos-Cavanzo JL, Ojeda-Mijares RI, Camacho-Rodríguez MA.. (2003). Fracturas en mujeres postmenopáusicas en el IMSS: y frecuencia costos de su atención hospitalaria. *Gaceta Médica de Mex.* 139(5): 453-458.

Vupputuri MR, Goswami R, Gupta N, Ray D, Tandon N, Kumar N. (2006). Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians. *Am J Clin Nutr.* 83:1411–9.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. (2006) RANKL - RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 12:17-25.

Wennberg C, Hesse L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res.* 15:1879 - 1888.

Wetmore CM, Ichikawa L, LaCroix AZ, Ott SM, Scholes D. (2008). Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. *Osteoporos Int.* 19 (4): 519 - 527.

Winston AP, Hardwick E, Jaber N. (2005). Neuropsychiatric effects of caffeine. *Advances in Psychiatric Treatment.* 11:432–439.

World Health Organization. (2003). Prevention and management of osteoporosis. World Health Organ Tech Rep Ser. No 921.

ANEXO A

Carta de Consentimiento Informado

Monterrey, Nuevo León a ____ de _____ del año _____

Por medio de la presente yo, _____ autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado “Asociación de la Densidad Mineral Ósea con el Polimorfismo *TaqI* del Gen del Receptor de la Vitamina D y con el Consumo de Cafeína en Mujeres Jóvenes”. El objetivo de este estudio es analizar la asociación entre la densidad mineral ósea con los diversos genotipos del polimorfismo *TaqI* y el consumo de cafeína en mujeres jóvenes de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la U.A.N.L.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: completar dos frecuencias de consumo de cafeína, permitir la extracción de una muestra de 5 ml de sangre, así como la realización del estudio que me permitirá conocer mi densidad mineral ósea (absorciometría dual de rayos X, DXA). Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: Por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematoma en el sitio del piquete de la vena. Por la prueba de medición de la densitometría ósea (con el método de DXA): al ser un procedimiento simple, rápido y no invasivo, no requiere preparación especial y se considera que no tiene efectos secundarios y sus riesgos son considerados mínimos. Con lo anterior se generará información para determinar la asociación entre polimorfismos en genes y la baja masa ósea en mujeres jóvenes. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte mis estudios en la Universidad Autónoma de Nuevo León. El investigador responsable del proyecto (Dr. Zacarías Jiménez Salas, celular: 044 8111900039) ha confirmado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Nombre y firma del participante

Nombre y Firma del Investigador responsable

Testigo 1

Testigo 2

ANEXO B

Cuestionario de frecuencia de consumo de cafeína

Expediente: _____

Fecha: _____

Favor de llenar solo los campos de las bebidas que suele tomar, especificando que bebida, la marca, la cantidad que consume y la frecuencia en cuestión de día, semana o mes, es decir, si usted consume 365ml de refresco 1 vez al día deberá escribir 1/d, o si lo consume 3 veces al mes 3/m o si lo consume 4 veces por semana 4/s y así con todas las bebidas que suele tomar en su dieta.

Bebida	Marca	Cantidad	Frecuencia
<u>Café</u>			
Soluble	_____	<input type="checkbox"/> 500ml <input type="checkbox"/> Taza <input type="checkbox"/> ____ml	_____
Americano	_____	<input type="checkbox"/> 500ml <input type="checkbox"/> Taza <input type="checkbox"/> ____ml	_____
Expreso	_____	<input type="checkbox"/> 500ml <input type="checkbox"/> Taza <input type="checkbox"/> ____ml	_____
Descafeinado	_____	<input type="checkbox"/> 500ml <input type="checkbox"/> Taza <input type="checkbox"/> ____ml	_____

Late _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Moca _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Chocolate con leche _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Té

Verde _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Negro _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Refrescos

Cola _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Sabor _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Cola light _____

500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Sin cafeína _____  500ml _____
 Taza _____
 _____ml

Bebidas energéticas

Red bull  473ml _____
 355ml _____
 250ml _____

b:ost  235ml _____
 _____ml

Monster  473ml _____
 _____ml

Medicamentos

Vivarin: Dosis _____ Frecuencia _____

NoDoz: Dosis _____ Frecuencia _____

Excedrin: Dosis _____ Frecuencia _____

Cafiaspirina: Dosis _____ Frecuencia _____

Next: Dosis _____ Frecuencia _____

ANEXO C

Soluciones

Buffer TE 10X (volumen final 1 L)

- 1.- EDTA 10 mM
- 2.- Tris-HCl 100 mM
- 3.- Ajustar a pH 8
- 4.- Aforar a un litro
- 5.- Esterilizar por 15 min a 121 Lb/pulg²

Buffer TE 1X (volumen final 25 mL)

- 1.- Buffer TE 10X 0.25 ml
- 2.- Agua ultrapura 24.75 ml

Buffer TAE 50X (Volumen final 1 L).

- 1.- Tris base 242 g
- 2.- Ácido acético glacial 57.1 ml
- 3.- EDTA (0.5M, pH 8.0) 100 ml
- 4.- Aforar a un litro con agua ultrapura.

SDS al 20% (Volumen final 100 mL)

- 1.- SDS 20 g
- 2.- aforar a 100 mL con agua ultrapura

EDTA 0.5M (Volumen final 100 mL)

- 1.- EDTA 18.6 g
- 2.- Agua ultrapura 80 ml
- 3.- Ajustar a pH 8.0 con NaOH
- 4.- Aforar a 100 ml
- 5.- Esterilizar por 15 min a 121 Lb/pulg²

EDTA 0.25M Volumen final 200 mL)

- 1.- EDTA 18.6 g
- 2.- Agua ultrapura 80 ml
- 3.- Ajustar a pH 8.0 con NaOH
- 4.- Aforar a 200 ml
- 5.- Esterilizar por 15 min a 121 Lb/pulg²

Buffer de lisis TSNT (volumen final 100 mL)

- 1.- Agua ultrapura 50 ml
- 2.- NaCL (100 mM) 0.584 g
- 3.- Tritón 100X (2%) 2 ml
- 4.- SDS 20% 5 ml
- 5.- EDTA 0.25M (1mM) 400 µl
- 6.- Tris HCl pH 8.0, 1M (10mM) 1ml
- 7.- Aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Buffer de carga de DNA (volumen final 100 mL)

- 1.- Azul de bromofenol 0.25 g
- 2.- Xilencianol 0.25 g
- 3.- Glicerol 30 ml
- 4.- Aforar a 100 mL con agua ultrapura

Etanol al 70% (volumen final 100 ml)

- 1.- Etanol absoluto 70 ml
- 2.- Agua ultrapura 30 ml

Agarosa 1% (volumen final 25 ml)

- 1.- Agarosa 0.25 g
- 2.- TAE 1X 25 ml