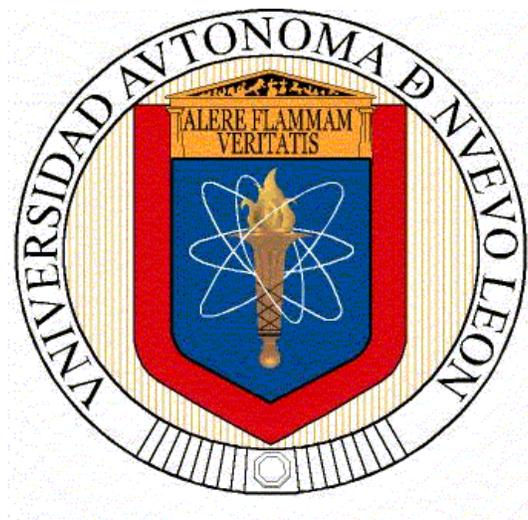


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



T E S I S

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MEF2C*,
JAG1 Y *BDNF* CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA
EN MUJERES DE 40 A 80 AÑOS**

Por:

LIC. NUT. SANDRA MARLEN GONZÁLEZ PEÑA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN NOVIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MEF2C*,
JAG1 Y *BDNF* CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA
EN MUJERES DE 40 A 80 AÑOS**

Por:

LIC. NUT. SANDRA MARLEN GONZÁLEZ PEÑA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

NOVIEMBRE DE 2014

Dr. en C.S. ESTEBAN GILBERTO RAMOS PEÑA
SUBDIRECTOR DE INVESTIGACIÓN INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN DE LA U.A.N.L.
P R E S E N T E:

Nos permitimos comunicar a usted que hemos concluido la Dirección y codirección de la tesis titulada: **“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES MEF2C, JAG1 Y BDNF CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES DE 40 A 80 AÑOS”** presentada por la **LN. SANDRA MARLEN GONZÁLEZ PEÑA** con la finalidad de obtener su grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“Alere Flammam Veritatis”
Monterrey, Nuevo León a 10 de Octubre de 2014



Dr. Zacarías Jiménez Salas
Director de Tesis



Dr. Rafael Velázquez Cruz
Co-Director de Tesis

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis **APROBÓ** la tesis titulada: **“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MEF2C*, *JAG1* Y *BDNF* CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES DE 40 A 80 AÑOS”** presentada por la LN. **Sandra Marlen González Peña** con la finalidad de obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

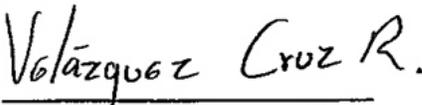
Monterrey Nuevo León, 29 de Octubre de 2014



Dr. Erik Ramírez López
PRESIDENTE



Dr. Zacarías Jiménez Salas
SECRETARIO



Dr. Rafael Velázquez Cruz
VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por darme la fe y la fortaleza que me permitieron finalizar esta etapa de mi vida profesional y por brindarme una vida llena de enseñanzas, experiencias pero sobre todo de felicidad.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico que recibí durante mis estudios en la Maestría en Ciencias en Nutrición. Al personal docente y administrativo de la Facultad de Salud Pública y Nutrición por el apoyo y las facilidades brindadas.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Zacarías Jiménez Salas, que como director de tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica, así como por su confianza y dedicación de tiempo. Al Dr. Rafael Velázquez Cruz, codirector de tesis, por su paciencia y asesoría durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Erik Ramírez López por su disposición para el desarrollo de la parte experimental de la investigación, por permitirme el uso de su equipo en el laboratorio de Composición Corporal. Así como a las personas con las que colaboré (becarias y pasantes) en el laboratorio de Genética y Biología molecular y en el laboratorio de Composición Corporal por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mis profesores y compañeras de maestría por la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a lo largo de mi formación en la maestría, por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

A mi familia y a mi novio por el apoyo moral que siempre me han brindado.

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño para mis padres, Martín y Sandra, por estar siempre a mi lado, por darme una carrera para mi futuro, por sus consejos, por su apoyo y por el amor brindado, por inculcar en mí valores, principios y coraje para conseguir mis objetivos, pero sobre todo por ser ejemplo de vida, constancia y perseverancia.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida, por estar conmigo apoyándome en todo momento y por representar la unidad familiar.

A mis abuelos por su temple inquebrantable y por su sabiduría. A ti abuelito Tino por ser ese ángel que cuida de mí en todo momento.

Al resto de mi familia por el apoyo y la confianza que depositaron en mí.

A mis amigas por confiar y creer en mí, porque siempre estuvieron en los momentos indicados para brindarme su ayuda.

A mi novio Jerami Sampayo por haberme apoyado en las buenas y en las malas, por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación, por su paciencia, comprensión y amor incondicional, que aunque nos separe la distancia siempre estas a mi lado.

3.7.2.	El gen <i>JAG1</i> gen involucrado en la diferenciación de células óseas.....	31
3.7.3.	<i>BDNF</i> gen involucrado en el metabolismo óseo.....	33
4.	JUSTIFICACIÓN.....	35
5.	HIPÓTESIS.....	37
6.	OBJETIVOS.....	37
6.1.	Objetivo general.....	37
6.2.	Objetivos específicos.....	37
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7.1.	Materiales.....	38
7.2.	Métodos.....	38
7.2.1.	Diseño del estudio.....	38
7.2.2.	Estrategia general.....	39
7.2.3.	Obtención de la información.....	42
7.2.4.	Densitometría ósea.....	42
7.2.5.	Determinaciones genéticas.....	43
7.2.5.1.	Extracción de sangre.....	43
7.2.5.2.	Extracción de DNA genómico.....	43
7.2.5.3.	Genotipificación de SNPs en genes candidatos.....	44
7.2.5.4.	PCR tiempo real.....	45
7.2.6.	Análisis estadístico.....	52
8.	RESULTADOS.....	53
8.1.	Características generales de la población.....	53
8.2.	Determinación de los polimorfismos de los genes <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i>	54
8.3.	Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i>	58
8.4.	Determinación de la asociación de los polimorfismos de los genes <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i> con densidad mineral ósea.....	60
9.	DISCUSIÓN.....	69

10. CONCLUSIONES.....	78
11. LITERATURA CITADA.....	79
12. ANEXOS.....	92
ANEXO A. Carta de Consentimiento Informado.....	92
ANEXO B. Invitación y reclutamiento de las pacientes.....	93

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Reactivos utilizados.....	38
II. SNPs analizados en este estudio.....	45
III. Sondas TaqMan® para SNPs de los genes <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i>	49
IV. Material y equipo requerido para la preparación de las muestras de DNA para PCR-TR.....	50
V. Cálculo de las cantidades de reactivos del mix de reacción....	51
VI. Condiciones de amplificación.....	51
VII. Características generales de la población estudiada.....	53
VIII. Frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos del gen <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i> en mujeres mexicanas.....	59
IX. Asociación del polimorfismo rs6514116 del gen <i>JAG1</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.....	62
X. Asociación del polimorfismo rs2273061 del gen <i>JAG1</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.....	63
XI. Asociación del polimorfismo rs2235811 del gen <i>JAG1</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas	64
XII. Asociación del polimorfismo rs6040061 del gen <i>JAG1</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas	65
XIII. Asociación del polimorfismo rs1366594 del gen <i>MEF2C</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.....	67
XIV. Asociación del polimorfismo rs6265 del gen <i>DBNF</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.....	68
XV. Densidad mineral ósea en diferentes poblaciones.....	71
XVI. Alelo de menor frecuencia de polimorfismos de <i>JAG1</i> , <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i> en diferentes poblaciones.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Epífisis de un hueso de adulto.....	8
2.	Representación esquemática de las células asociadas al hueso.....	10
3.	El origen de los osteoclastos.....	14
4.	El osteoclasto.....	16
5.	Vía de señalización Wnt canónica.....	22
6.	Señalización Notch en la homeostasis ósea.....	24
7.	Localización genómica de <i>MEF2C</i> y polimorfismos asociados con DMO.....	30
8.	Localización genómica de <i>JAG1</i> y polimorfismos asociados con DMO.....	31
9.	Interacción entre Jagged1 y la vía de señalización Notch.....	32
10.	Localización genómica de <i>BDNF</i> y del polimorfismo rs6265.....	34
11.	Estrategia general de trabajo.....	41
12.	Método de PCR tiempo real utilizando sondas TaqMan.....	47
13.	Gráficas de discriminación alélica de los polimorfismos de <i>JAG1</i>	55
14.	Gráficas de discriminación alélica de los polimorfismos de <i>MEF2C</i> y <i>BDNF</i>	56
15.	Gráficas de discriminación alélica y de amplificación de los polimorfismos monomórficos de <i>MEF2C</i>	57

LISTA DE SÍMBOLOS/ABREVIATURAS

Nomenclatura	Significado
APC	Proteína de la enfermedad de la poliposis adenomatosa del colon
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BDNF-M66	Isoforma de la proteína BDNF con residuos de metionina
BDNF-V66	Isoforma de la proteína BDNF con residuos de valina
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
CBFA1	Factor fijador central alfa 1
CHEK2	Proteína quinasa serina/treonina
c-fos	Factor de transcripción <i>c-fos</i>
CFU-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos neutrófilos
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de células progenitoras hematopoyéticas mononucleares
CFU-GMM	Unidad formadora de colonias de células madre mieloides multipotenciales
CFU-M	Unidad formadora de colonias de monocitos
DMO	Densidad mineral ósea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXA	Absorsimetría dual de rayos X
g/cm ²	Gramos/centímetros cuadrados
GH	Hormona de crecimiento
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
H ⁺	Protón
H ⁺ -ATPasa	Bomba de protones dependiente de ATP

H ₂ CO ₃	Ácido carbónico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HSCs	Células hematopoyéticas
IGF	Factores de crecimiento símil insulina
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina -6
IMC	Índice de masa corporal
IOF	Fundación Internacional de Osteoporosis
JAG1	Gen JAG1
Kg	Kilogramo
L1-L4	Lumbar 1 - Lumbar 4
L2-L4	Lumbar 2 - Lumbar 4
M	Metionina
MAML	Co-activador transcripcional mastermind-like
M-CSF	Factor estimulantes de colonias de monocitos
MEF2C	Factor promotor de miocitos 2c
MSC	Células madre mesenquimales
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NFATc1	Factor nuclear de células T activadas citoplásmico1
NFxB	Factor de transcripción NFxB
NICD	Dominio intracelular Notch
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Osteoporosis
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
Pre-Ob	Preosteoblastos inmaduros
Pre-OCS	Preosteoclastos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factores de crecimiento derivados de las plaquetas

PTH	Parathormona
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Molécula ligando de RANK
SNP	Polimorfismos de un nucleótido único
SOST	Gen esclerostina
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tcf-Lef1	Factor derivado de células T/Factor de unión al potenciador linfoide 1
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
V	Valina
VDR	Gen receptor de la vitamina D

1. RESUMEN

Introducción: la osteoporosis (Op) es consecuencia de la baja densidad mineral ósea (DMO), deteriora el tejido óseo incrementando su fragilidad. En México, el 17% de las mujeres y el 9% de los hombres mayores de 50 años presentan osteoporosis. Estudios recientes han identificado algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* asociados con variaciones en la DMO. **Objetivo:** analizar la asociación de 8 SNPs de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* con DMO en mujeres mexicanas de 40 a 80 años. **Métodos:** se incluyeron 124 mujeres de 40 a 80 años (aparentemente sanas) de Nuevo León. Para determinar la DMO de las participantes se realizó densitometría dual de rayos X (DXA) en cuerpo total (DMO-CT), cadera total (DMO-C), cuello femoral (DMO-CF), triángulo de Wards (DMO-TW), en trocánter (DMO-T) y en columna lumbar anteroposterior L1-L4 y L2-L4 (DMO L1-L4, DMO L2-L4). Además, se recolectó sangre periférica en tubos EDTA para extraer DNA genómico. Los SNPs de *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* se determinaron por PCR tiempo real (PCR-TR) utilizando sondas TaqMan. Los datos obtenidos se analizaron a través de un modelo de regresión lineal en el software SPSS v.20. **Resultados:** las participantes tuvieron una edad promedio de 63.45 ± 9.02 años; un promedio de DMO-CT= 1.058 ± 0.099 g/cm², DMO-C= 0.926 ± 0.127 g/cm², DMO-CF= 0.862 ± 0.120 g/cm², DMO-TW= 0.682 ± 0.137 g/cm², DMO-T= 0.749 ± 0.115 g/cm², DMO-L1-L4= 0.999 ± 0.154 g/cm², DMO-L2-L4= 1.018 ± 0.165 g/cm². Se encontró asociación estadísticamente significativa con DMO-CT baja en el modelo recesivo en el SNP rs2235811 ($p= 0.024$) del gen *JAG1*. En el resto de los SNPs sólo se encontró tendencias tanto a baja como a alta DMO en diferentes regiones óseas. Los SNPs rs12521522 y rs11951031 no fueron polimórficos en nuestra población de estudio. **Discusión y conclusión:** a pesar de sólo encontrar asociación con un polimorfismo de todos los SNPs y las regiones óseas analizadas, los estudios previos en otras poblaciones demuestran la relación de dichos SNPs con variaciones en la DMO, por lo que estos podrían tener un papel en la variación de la DMO en mujeres del norte del país. En conjunto, estos resultados sugieren que tanto los polimorfismo de *JAG1* como los de *MEF2C* y *BDNF* desempeñan un papel en la variación de la DMO en diferentes grupos étnicos.

2. INTRODUCCIÓN

La Osteoporosis (Op) es un “trastorno esquelético sistémico caracterizado por baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo” (Muñoz-Torres, Varsavsky, & Avilés- Pérez, 2010); además, es un problema de índole global, cuya relevancia va en incremento debido al envejecimiento de la población. Esta enfermedad, además de ser la más común de todos los trastornos metabólicos del hueso (Guglielmi, Muscarella, & Bazzocchi, 2011), al presentar una densidad mineral ósea (DMO) disminuida, predispone a la persona a un incremento en la susceptibilidad de fracturas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2003).

Debido a los continuos avances en la salud, se estima un aumento promedio de seis años en la expectativa de vida para el año 2050. Es probable que este factor garantice un crecimiento constante de la población anciana en las próximas décadas, lo que conllevará a un consecuente incremento en el número de fracturas. Se ha calculado que en el año 2050 se producirán 6,3 millones de fracturas por año en todo el mundo y más de la mitad ocurrirá en América Latina y Asia (International Osteoporosis Foundation [IOF], 2012).

Otro de los factores de riesgo que desencadenan la presencia de una DMO baja, riesgo de fracturas y Op es el género, pues se observa una mayor prevalencia de Op en mujeres. Esto debido a las diferencias fisiológicas, nutricionales y hormonales que se presentan entre los hombres y las mujeres, siendo éstas, las mayormente afectadas por dicha enfermedad (Balch, 2000).

Además de la edad y el género, el factor genético también juega un papel importante en la aparición de Op y/o en la susceptibilidad a fracturas ya que poseen una heredabilidad estimada entre el 60 y 85% (Ng et al., 2006). Recientemente se han identificado algunos genes que se asocian con DMO ya que están involucrados en procesos de diferenciación de células madre mesenquimales a células óseas, participan en vías de señalización involucradas en el remodelado óseo o se expresan en células óseas; tal es el caso de los

genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF*. El gen *MEF2C* participa en la regulación de la expresión de esclerostina, que controla la actividad osteoblástica (Gifre et al., 2013). Por otro lado, el gen *JAG1* está involucrado en la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales (Zhu, Sweetwyne, & Hankenson, 2013). Mientras que el gen *BDNF* regula la osteoblastogénesis y la formación ósea a través de la expresión de marcadores óseos (Deng et al., 2013).

En este trabajo se consideró importante identificar la asociación entre la DMO de mujeres de 40 a 80 años y 8 polimorfismos de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF*. Al finalizar el estudio se obtuvieron los valores de densidad mineral ósea, así como la frecuencia de los polimorfismos. Estos resultados permitieron determinar la asociación entre la DMO y estos polimorfismos en nuestra población.

2.1 Definición del problema

La Op es la enfermedad más común de todos los trastornos metabólicos del hueso (Guglielmi et al., 2011), se presenta sobre todo como resultado del envejecimiento normal y es caracterizada por una baja densidad mineral ósea (DMO) y el deterioro de la microarquitectura del hueso, que en consecuencia conduce a un aumento en el riesgo a padecer fracturas (OMS, 2003). Las fracturas osteoporóticas son un problema grave de salud pública ya que están asociadas a una morbilidad significativa y a un incremento en la mortalidad (Dennison, Mohamed, & Cooper, 2006), siendo la cadera, columna y muñeca los sitios más comunes de fractura (Harvey, Dennison, & Cooper, 2010).

Se estima que en todo el mundo, una persona sufre una fractura osteoporótica cada 3 segundos y una fractura vertebral cada 22 segundos; además, una de cada dos mujeres mayores de 50 años sufrirá una fractura osteoporótica en algún momento de su vida; mientras que la posibilidad de que una mujer sufra una fractura de cadera o columna vertebral en toda su vida alcanza aproximadamente el 14 y 28% respectivamente, derivando que las fracturas en ambos sitios representan un índice importante de morbilidad y mortalidad (IOF, 2012).

En México, el 17% de las mujeres y el 9% de los hombres mayores de 50 años presentan Op, y se estima que el número total de casos de fracturas de cadera fue de aproximadamente 21,000 en el 2005 y se proyecta que llegue a 110,055 para el año 2050, un incremento del 431% (Clark, Carlos, & Vázquez-Martínez, 2010).

Como se describió anteriormente, la Op se presenta principalmente como resultado del envejecimiento normal, pero puede surgir también como resultado del deterioro del desarrollo de la masa ósea máxima (p. ej., debido a retrasos en la pubertad o la desnutrición), a la excesiva pérdida de masa ósea durante la edad adulta (p. ej., debido a la deficiencia de estrógenos en las mujeres, la desnutrición, o uso de corticosteroides) (OMS, 2003), así como por el peso

corporal, pues algunos estudios han mostrado una correlación negativa entre el índice de masa corporal (IMC) y la masa ósea. Es decir, un bajo IMC y una pérdida de peso corporal son asociados con una menor densidad mineral ósea (DMO) que deriva en un incremento en el riesgo de fracturas (Christodoulou & Cooper, 2003).

Otros factores que predisponen a la presencia de Op son los factores genéticos, pues se han identificado genes candidatos asociados a una baja densidad mineral ósea, entre los que se encuentran *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF*. Evidencia reciente sugiere que algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de estos genes pueden estar asociados a la pérdida de masa ósea. Las variantes genotípicas (rs1366594, rs12521522 y rs11951031) del gen *MEF2C* se han estudiado en población Europea, Asiática y México-americana (Zheng et al., 2013), de la misma manera que el polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* ha sido estudiado en individuos caucásicos de origen europeo y en sujetos del centro y sur de China (Deng et al., 2013). Por otra parte, las variantes genotípicas (rs651411, rs2273061, rs2235811 y rs6040061) del gen *JAG1*, además de ser estudiadas en sujetos de Europa, Asia e individuos estadounidenses, recientemente se investigó la asociación de dichas variantes con densidad mineral ósea en mujeres México-mestizas del Distrito Federal (Rojano-Mejía et al., 2013).

En síntesis, las investigaciones previas han asociado estos genes y sus polimorfismos con densidad mineral ósea en diferentes áreas (por ejemplo en antebrazo, espina lumbar, cadera total y cuello femoral) sin embargo, los resultados no han sido del todo consistentes en estudios realizados en otras poblaciones.

3. ANTECEDENTES

3.1 Tejido óseo

El esqueleto humano está formado por huesos, los cuales son tejido conjuntivo especializado, también denominado tejido óseo; posee células y matriz extracelular mineralizada formada por fosfato de calcio, razón por la que este tejido es muy duro, de manera que provee sostén y protección al resto de los órganos (Ross & Pawlina, 2008).

Lo que diferencia a este tejido de otros, es que posee una matriz mineralizada formada por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (Ross & Pawlina, 2008), y en menor proporción por carbonato de calcio, hidróxido de magnesio, fluoruro y sulfato. De manera que, cuando estas sales se depositan en la matriz del tejido óseo, se cristalizan y el tejido se endurece (Garzón-Alvarado, Roa-Garzón & Cortés-Rodríguez, 2004).

Gracias a su contenido mineral, el tejido óseo funciona también como depósito de calcio y fósforo, de manera que éstos pueden ser movilizados de la matriz ósea hacia la sangre y viceversa, dependiendo de las necesidades del organismo. En resumen, el tejido óseo además de dar protección y sostén a los órganos, también participa en la homeostasis del calcio (Devlin, 2004).

La matriz ósea, también está formada por proteínas, de las cuales, el 90% de éstas son proteínas colágenas, principalmente colágeno tipo I; el resto (10%) son proteínas no colágenas, que participan en el desarrollo, crecimiento, remodelado y reparación de los huesos. De acuerdo con Ross & Pawlina (2008), las principales proteínas no colágenas que posee la matriz ósea son:

- *Macromoléculas de proteoglicanos:* estas proteínas le proporcionan al hueso resistencia a la compresión, además, se encargan de fijar factores de crecimiento, así como de inhibir la mineralización.
- *Glucoproteínas multiadhesivas:* como su nombre lo indica, unen o adhieren las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia

fundamental mineralizada. Entre ellas se encuentran la *osteonectina* (se encarga de unir el colágeno y los cristales de hidroxapatita), las *sialoproteínas* como la *osteopontina* (regula la unión de las células a la matriz ósea) y las *sialoproteínas I y II*, que se encargan de regular la adhesión celular y durante el proceso de mineralización, dan inicio a la formación del fosfato de calcio.

- *Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas*: entre estas proteínas esta la *osteocalcina*, la cual tiene la función de atrapar el calcio desde la circulación, además de estimular y atraer a los osteoclastos en el remodelamiento óseo.
- *Factores de crecimiento y citosinas*: entre estas proteínas reguladoras se encuentran el factor de crecimiento insulínico tipo 1, los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), *las proteínas morfogénicas óseas (BMP)* y las interleucinas (IL-1, IL-6). De éstas, las de mayor relevancia son las BMP, ya que estimulan la diferenciación de las células mesenquimáticas (células específicas del tejido conjuntivo embrionario) a osteoblastos (células que forman tejido óseo) (Kühnel, 2005).

La matriz ósea, además de proteínas y algunos minerales, también posee pequeños espacios denominados *lagunas osteocitarias* u *osteoplastos*, en cada uno de ellos se encuentra una célula ósea conocida como *osteocito*. Para que los osteocitos estén en contacto con osteocitos vecinos, la matriz ósea tiene unos túneles estrechos llamados *canalículos* o *conductos calcóforos* (Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología, 2010).

3.1.1 Estructura del tejido óseo

Los huesos, además de estar formados por tejido óseo, también están compuestos por otros tejidos conjuntivos como el tejido hematopoyético y adiposo, además de vasos sanguíneos y nervios. Y si el hueso se ubica en una

articulación móvil o sinovial, está presente el cartílago hialino (Ross & Pawlina, 2008).

Es bien sabido que los huesos del cuerpo humano son de diferentes formas y tamaños, sin embargo tienen una estructura común, por lo que el tejido óseo de acuerdo a su estructura macroscópica se clasifica de la siguiente manera (Figura 1):

- *Tejido óseo compacto o denso*: se encuentra en la superficie externa del hueso, existen pocos espacios entre sus componentes y le proporcionan al hueso resistencia a las cargas por el peso y movimientos (Welsch, 2008).
- *Tejido óseo esponjoso o trabeculado*: está formado por laminillas dispuestas de manera irregular en columnas delgadas de hueso denominadas trabéculas. Es decir, el tejido óseo esponjoso es más ligero que el compacto, y además, tiene un aspecto de malla que contiene espacios macroscópicos en donde se ubica la médula ósea roja (encargada de la hematopoyesis) y vasos sanguíneos (Garzón-Alvarado et al., 2004; Welsch, 2008).



Figura 1. Epífisis de un hueso de adulto. Corte longitudinal de la epífisis de un hueso largo. La posición externa (flechas) corresponde al hueso compacto, mientras que la parte interna y trabeculado o poroso corresponde al hueso esponjoso (tomado de Ross & Pawlina, 2008).

3.1.2 Superficie externa del hueso y cavidades óseas

Los huesos están recubiertos por un tejido conjuntivo denso y fibroso denominado *periostio*, el cual contiene células osteoprogenitoras (células que secretan matriz ósea). Si en la superficie del hueso se está formando tejido óseo, las células periósticas pueden sufrir mitosis y transformarse en osteoblastos (Ross & Pawlina, 2008).

Las cavidades óseas, tanto del hueso compacto como del esponjoso, están recubiertas por *endostio*, es decir, por una capa de células de tejido conjuntivo, que al igual que el periostio, contiene células osteoprogenitoras que se diferencian a osteoblastos y a células de revestimiento óseo. Sin embargo, ya que se ubican en la parte interna de las cavidades óseas, suelen denominarse *células endósticas* (Castelo-Branco & Haya-Palazuelos, 2008; Lindhe, Lang & Karring, 2009).

3.1.3 Células del tejido óseo

El tejido óseo está compuesto por cinco tipos de células, cuatro de las cuales se originan a partir de un mismo tipo celular básico (células madre mesenquimáticas), estas son las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y las células de revestimiento óseo. El otro tipo de célula, los osteoclastos se origina a partir de una línea celular diferente y participa en la resorción ósea (Figura 2) (Garzón-Alvarado et al., 2004; Welsch, 2008).

3.1.3.1 Células osteoprogenitoras

Para tener una mayor comprensión de la función de las células osteoprogenitoras, es necesario conocer su procedencia, las células madre mesenquimales (MSC). Éstas, son células específicas del tejido conjuntivo embrionario (Kühnel, 2005), que posteriormente por diferenciación celular se generan patrones de desarrollo diferentes, y con esto se originan tejidos más especializados (Lindhe, Lang, & Karring, 2009), que intervienen en la reparación y en la formación de tejido nuevo.

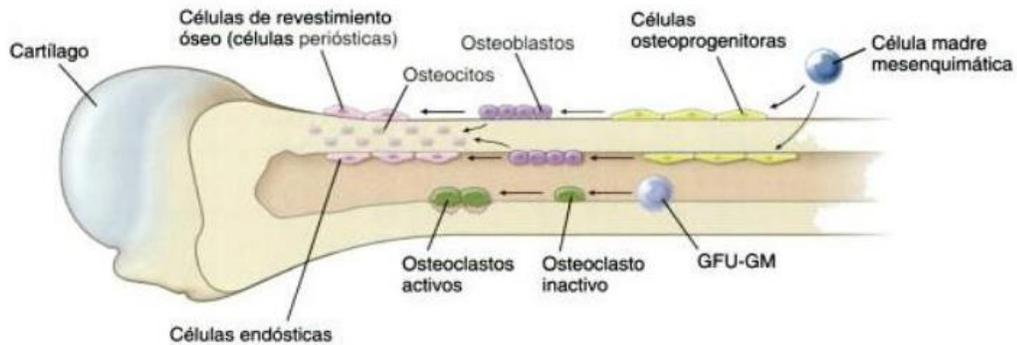


Figura 2. Representación esquemática de las células asociadas al hueso. Las células óseas, con excepción de los osteoclastos se originan a partir de las células mesenquimáticas, que se diferencian en células osteoprogenitoras, osteoblastos, y finalmente, en osteocitos y células de revestimiento óseo. Las células de revestimiento óseo ubicadas en la parte externa del hueso se denominan células periósticas, en cambio, las que se localizan en la parte interna se les llama células endósticas. Fuente: Ross & Pawlina (2008).

Las células osteoprogenitoras son células indiferenciadas, es decir, que durante la *osteogenesis* (proceso por el que se genera tejido óseo nuevo) (Ross & Pawlina, 2008), estas células se dividen y diferencian a células formadoras de hueso, conocidas como *osteoblastos*. Además de diferenciarse en osteoprogenitoras, las células MSC también pueden diferenciarse en otros tipos de células, como fibroblastos, adipositos, condrocitos y células musculares (Castelo-Branco & Haya-Palazuelos, 2008).

En la médula ósea se generan las células mesenquimales que por la acción de una proteína morfogénica ósea se diferencian a osteoprogenitoras, y éstas a su vez, se convierten en osteoblastos gracias al factor fijador central alfa 1 (CBFA1), así como también a las BMP que también participan en la diferenciación de los osteoblastos dependiendo de las necesidades de células óseas (Ross & Pawlina, 2008).

Para llevar a cabo esta función, las células osteoprogenitoras se localizan tanto en la superficie externa e interna de los huesos, es decir, comprenden las células periósticas y las células endósticas (Cediel et al., 2009).

3.1.3.2 Osteoblastos

Los osteoblastos se ubican en el periostio y en el endostio del hueso; son células biosintéticas que se activan con el estímulo de la parathormona (PTH), los estrógenos, la vitamina D (1,25-dihidroxitamina D) y por la leptina, para iniciar con la síntesis de la matriz orgánica del hueso (formada por colágeno I, glucoproteínas y proteoglicanos), que pasa a formar el osteoide (célula ósea no mineralizada o material precursor óseo) (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008).

Los osteoblastos también sintetizan proteínas no colágenas como las proteínas fijadoras de calcio (osteocalcina y osteonectina), glucoproteínas multiadhesivas (sialoproteínas óseas I y II), glicosaminoglicanos y osteopontina, que interactúan con las integrinas, que en conjunto se encargan de la regulación del calcio y del fósforo. Dicho mecanismo es esencial para el depósito de cristales de hidroxapatita (Castelo-Branco & Haya Palazuelos, 2008).

En un principio, la matriz que secreta el osteoblasto no se encuentra mineralizada, para que esto se lleve a cabo, los osteoblastos se encargan de la calcificación de la matriz gracias a que su membrana es rica en fosfatasa alcalina que incrementa la concentración de fosfato, y este favorece el aumento adicional de las concentraciones de calcio en la región donde dará inicio la mineralización. Es por esta razón que las concentraciones plasmáticas de fosfatasa alcalina, así como de osteocalcina, son considerados marcadores de la actividad osteoblástica (Fuentes-Arderiu, Castiñeiras-Lacambra, & Queraltó-Compañó, 1998).

Después de aproximadamente dos o tres meses de ser activados los osteoblastos, terminan su actividad formadora de hueso y pasan a un estado inactivo. Si los osteoblastos inactivos se localizan en la superficie del hueso se les denomina *osteocitos de superficie* o *células de recubrimiento óseo*. Por otra parte, los osteoblastos que quedan atrapados en el interior del hueso compacto, de manera que ahora forman parte de la matriz neoformada, pasan a ser *osteocitos* o por el contrario, pueden morir por apoptosis (Eynard et al., 2008).

Además de su papel como formadores de hueso, los osteoblastos también participan en la degradación ósea, ya que son capaces de degradar el borde del osteoide que se encuentra en la superficie de la matriz, de forma que queda libre el acceso a la matriz calcificada para los osteoclastos. Ya que los osteoblastos son las únicas células óseas que tiene receptores para la PTH, ante un estímulo de esta hormona, los osteoblastos liberan enzimas que degradan el hueso, así como citosinas que estimulan a los osteoclastos (Welsch, 2009).

3.1.3.3 Osteocitos

Cuando los osteoblastos finalizan su función y quedan encerrados en la matriz ósea dura, pasan a denominarse osteocitos, que ahora se encargan de mantener la matriz ósea. De las células que forman el hueso maduro, el 90% de ellas son osteocitos. Se considera que estas células óseas están en el estadio más maduro en el proceso de diferenciación de los osteoblastos. Cada osteocito se ubica en una laguna u osteoplasto y su citoplasma tiene muchas prolongaciones por lo que adquiere un aspecto estrellado. Además, son ricas en microfilamentos, los cuales hacen posible que estén en contacto tanto con células de revestimiento de la superficie matricial, como con otros osteocitos cercanos (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

La mecanotransducción es una de las funciones que desempeñan los osteocitos, es decir, que ante estímulos mecánicos (por ejemplo al incremento de la carga mecánica o la falta de gravedad), los osteocitos son capaces de registrar diferencias de potencial, con lo que modifican la expresión génica y el proceso de apoptosis celular (Cediel et al., 2009).

Estas células poseen una menor actividad biosintética, sin embargo, sintetizan condroitín sulfato, ácido hialurónico y queratán sulfato, que participan en la homeostasis fosfocálcica, así como en la transducción de señales biomecánicas antes mencionadas. Con esto, dan inicio al recambio y a la remodelación ósea, dependiendo de las necesidades del organismo, de manera

que contribuyen a la homeostasis del calcio en sangre (calcemia) (Eynard et al., 2008).

Cuando un osteocito muere por algún traumatismo (por ejemplo una fractura), por envejecimiento celular o por apoptosis, se inicia la resorción ósea por la acción de los osteoclastos y, posteriormente, los osteoblastos prosiguen con la reparación o remodelado del tejido óseo (Ross & Pawlina, 2008).

Los osteocitos pueden permanecer décadas en el hueso sano que no se recambia, sin embargo, es posible ver lagunas vacías en el hueso viejo, esto indica que se produjo apoptosis. Esta apoptosis es esencial para el recambio óseo, pero si es de forma masiva puede ser dañina para la estructura ósea (Castelo-Branco & Haya-Palazuelos, 2008).

En resumen, los osteocitos se encargan de comunicar las señales de carga y esfuerzo, así como de regular el metabolismo del tejido óseo (Rodríguez-Merchán, Ortega-Andreu, & Alonso-Carro, 2003).

3.1.3.4 Células de revestimiento óseo u osteocitos de superficie

Las células de revestimiento óseo (lining cells), corresponden a los osteoblastos inactivos que recubren la parte externa o superficial del hueso. Estas células adquieren una forma aplanada y están dispuestas sobre la capa delgada de matriz no mineralizada, que está compuesta principalmente por colágeno tipo I. Este tipo de células se localizan en las regiones en donde no se llevan a cabo los procesos de resorción o formación ósea. Otra característica de las células de revestimiento es que secretan colagenasas, estas enzimas degradan la capa de colágeno, de manera que queda expuesta la matriz ósea mineralizada para que posteriormente los osteoclastos ejerzan su acción sobre ellas (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

3.1.3.5 Osteoclastos

Los osteoclastos son células grandes que se ubican sobre la superficie del hueso. Son células multinucleadas que se encargan de la eliminación de tejido óseo para la liberación de minerales, proceso denominado resorción ósea, el

cual se realiza en dos pasos: 1) los osteoclastos secretan ácidos que producen el ambiente necesario para la solubilidad del mineral, y 2) secretan enzimas proteolíticas que destruyen la matriz orgánica (Gal-Iglesias, López-Gallardo, Martín-Velasco, & Prieto-Montalvo, 2007).

Los osteoclastos provienen de la unión de las células progenitoras hematopoyéticas mononucleares (CFU-GM) con células del estroma de la médula ósea. Las células del estroma producen citosinas (como el factor estimulante de colonias de monocitos [M-CSF], el TNF [factor de necrosis tumoral] e interleucinas) necesarias para la diferenciación de las CFU-GM en osteoclastos. Estas citosinas interactúan con los factores de transcripción *c-fos* y *NFB*, expresados en la superficie de las células preosteoclásticas. Después de esto, se expresa el *receptor activador del factor nuclear kB* conocido como *RANK* (receptor activator of nuclear factor kB), este, a su vez, interactúa con el *ligando de RANK (RANKL)* proveniente de la estroma (Figura 3) (Fitzgerald, Kaufer, & Malkani, 2004).

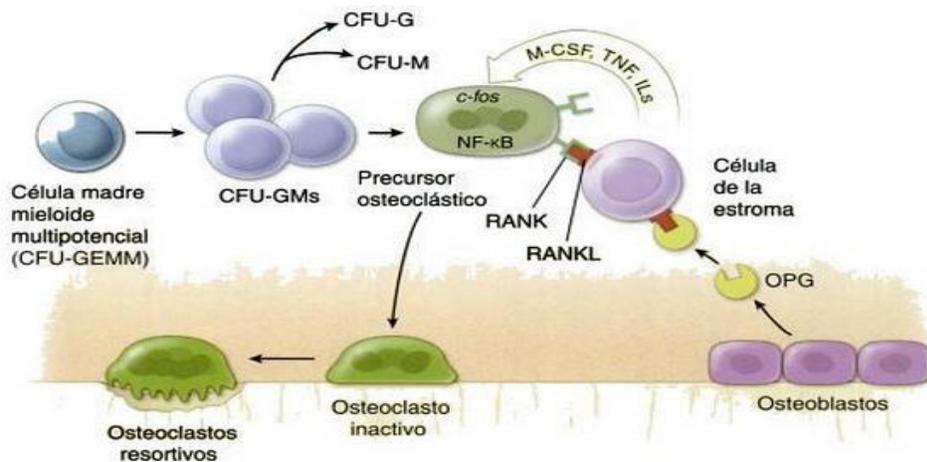


Figura 3. El origen de los osteoclastos. Los osteoclastos descienden de las células progenitoras hemopoyéticas mononucleares (CFU-GM), y éstas a su vez, se originan por las células madre mieloides multipotenciales (CFU-GMM). Las CFU-GMM también dan origen a los granulocitos neutrófilos (CFU-G) y a los monocitos (CFU-M). Para que se formen osteoclastos, las células del estroma de la médula ósea secretan factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) y algunas interleucinas (IL). Por otro lado, los precursores osteoclásticos expresan *c-fos*, *Nf-kB* y moléculas receptoras *RANK*. Este receptor se une a la molécula ligando de *RANK (RANKL)*, lo que ocasiona la diferenciación y maduración de los osteoclastos. Fuente: Ross & Pawlina (2008).

La interacción entre los mecanismos RANK-RANKL son vitales tanto para la diferenciación como para la maduración de los osteoclastos, es decir, para que los osteoclastos inactivos se activen. Sin embargo, esta vía puede ser obstaculizada por la osteoprotegerina (OPG), producto principal de los osteoblastos, la cual está regulada por la PTH, por la interleucina-1, así como por la 1,25 hidroxivitamina D. Esta obstaculización ocasiona que no haya formación de osteoclastos y por consecuencia la inhibición de la resorción ósea (Zanchetta & Talbot, 2001).

3.2 Resorción ósea

Para que se lleve a cabo la resorción ósea es necesario que los osteoclastos estén activos. Una vez que el osteoclasto está activo, se identifican 3 regiones (Figura 4):

- La superficie de los osteoclastos en la que se lleva a cabo la resorción ósea se le conoce como *borde rugoso, festoneado o vellosos*, ya que posee numerosas microvellosidades irregulares dotadas con microfilamentos de actina. Dichas vellosidades incrementan la superficie para la liberación de enzimas hidrolíticas y para la secreción de protones de las bombas de protones dependientes de ATP. Los osteoclastos se unen a los componentes de la matriz (principalmente a la osteopontina) gracias a una integrina de la membrana celular.
- La *zona clara o compartimento subosteoclástico* es la región sellada que comprende el espacio entre el borde rugoso y la superficie ósea, es aquí en donde se lleva a cabo la resorción de la matriz. En esta zona, la membrana plasmática del osteoclasto posee moléculas de adhesión que sellan la membrana a la matriz ósea mineralizada (Canby, 2007).
- En la región basolateral las vesículas que contienen el material degradado procedente de la endocitosis ocurrida en el borde rugoso, liberan su contenido en esta zona (Silverthorn, 2009).

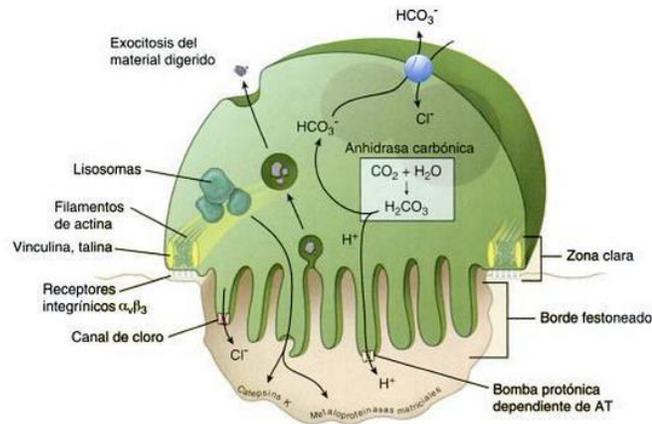


Figura 4. El osteoclasto. Esta imagen muestra la estructura que posee el osteoclasto. La zona clara se encuentra rodeada por vinculina y talina, que son proteínas de unión a la actina. Por otra parte, la membrana ubicada en la zona clara contiene moléculas de adhesión célula-matriz extracelular denominadas integrinas. Fuente: Ross & Pawlina (2008).

Una vez que el osteoclasto se une a la superficie ósea, inicia la resorción con la liberación de enzimas hidrolíticas lisosomales (como la catepsina K [cisteína proteasa] y las metaloproteinasas) hacia el espacio extracelular (zona clara), esto ocasiona la degradación del área mineral y de los compuestos orgánicos de la matriz ósea. Conforme se realiza la resorción ósea, también denominada *osteólisis*, los osteoclastos van formando cavidades en la superficie ósea llamadas *lagunas de Howship* (Ross & Pawlina, 2008).

Antes que se inicie la degradación de la matriz ósea, ésta tiene que ser descalcificada. Este proceso se lleva a cabo a través de la acidificación de la superficie del hueso, de manera que se disuelve el mineral. Para esto, en el citoplasma se encuentra la anhidrasa carbónica II, esta enzima produce ácido carbónico (H_2CO_3) que se disocia en bicarbonato (HCO_3^-) y un protón (H^+). Posteriormente, gracias a que los osteoclastos tienen en su membrana plasmática (en el borde rugoso) una bomba de protones dependiente de ATP (H^+ -ATPasa), se liberan protones formando con esto una solución ácida que degrada la matriz mineral del hueso. Al liberarse los protones se reduce el pH extracelular aproximadamente a 4, esto hace posible que se solubilice el fosfato de calcio (Jiménez & Merchant, 2003).

Cuando finaliza el proceso resorptivo en el tejido óseo, los osteoclastos sufren apoptosis. Este proceso resorptivo está regulado por la producción de catepsina K (degrada el colágeno), anhidrasa carbónica II, hidrogeniones y por fosfatasa ácida tártraro-resistente. Ante la deficiencia de estas proteínas se desarrolla osteoporosis ya que la función osteoclástica esta alterada, lo que ocasiona que los huesos sean frágiles incrementando el riesgo de fractura (Castelo-Branco & Haya-Palazuelos, 2008).

Otro medio por el que se regula la actividad osteoclástica es a través de la PTH y la vitamina D (1,25-hidroxivitamina D) que ejercen influencia en la diferenciación celular ósea, así como en la actividad de los osteoclastos. Ya que los osteoblastos poseen receptores para PTH y vitamina D, que al ser estimulados por estas sustancias, sintetizan citosinas (interleucina 1, 6 y 11). Dichas citosinas influyen en la proliferación y en la mitosis de los osteoclastos progenitores. Un incremento en la concentración de PTH favorece la resorción ósea, y por el contrario, la calcitonina (producto de las células parafoliculares [glándula tiroides]) disminuye la acción de los osteoclastos teniendo un efecto compensador (López-Chicharro & López-Mojares, 2008).

Durante el proceso de resorción ósea, los osteoclastos además de movilizar calcio y fósforo, también movilizan magnesio e hidroxapatita, por lo que estas sustancias se utilizan como marcadores de su función biológica (Miján de la Torre, 2002).

3.3 Regulación hormonal del tejido óseo

El mecanismo del remodelamiento óseo también está regulado por hormonas que tienen un papel esencial en el metabolismo del hueso en el que participan principalmente las siguientes hormonas: la hormona paratiroidea (PTH), un metabolito activo de la vitamina D₃ el 1,25-calciferol-OH, la calcitonina y en menor dimensión la hormona de crecimiento (GH), tiroxina, glucocorticoides y esteroides sexuales (Neyro-Bilbao, Cano-Sánchez, & Palacios-Gil, 2011).

La PTH es una hormona hipercalcemiente que es sintetizada y almacenada en las células de la glándula paratiroides, además actúa en tres niveles: 1) en el hueso estimula los osteoclastos favoreciendo la resorción ósea, actuando en conjunto con la vitamina D, 2) en el riñón aumenta la reabsorción tubular distal de calcio y 3) en el intestino actúa indirectamente, pues estimula la síntesis de 1,25-OH-colecalciferol, que incrementa la absorción de calcio (López-Chicharro & López-Mojares, 2008).

La secreción de calcitonina producida en las células C o células parafoliculares de la glándula tiroides, depende de los niveles séricos de calcio; ante una concentración alta de Ca^{++} se incrementa la secreción de calcitonina; por el contrario, si disminuyen los niveles séricos de Ca^{++} , la calcitonina también baja. Además, la calcitonina disminuye las concentraciones plasmáticas de calcio inhibiendo la resorción ósea, ya que actúa directamente sobre los osteoclastos uniéndose a los receptores de membrana ocasionando una disminución del número y de la actividad de los osteoclastos. Es decir, la calcitonina se encarga de proteger el tejido óseo de la acción de la PTH y de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, por esta razón se considera una hormona protectora del tejido óseo (Fernández-Tresguerres, Alobera-García, Canto-Pingarrón, & Blanco-Jerez, 2006).

Por otra parte, la vitamina D_3 es sintetizada en mayor cantidad por la piel debido a la acción de los rayos UV del sol y se obtiene en menor cantidad por la alimentación. Posteriormente, la vitamina D_3 se transforma en 25(OH) calciferol o calcidiol en hígado y en el riñón se transforma en 1-25(OH) colecalciferol, que es la forma biológicamente activa de manera que aumenta la reabsorción tubular proximal de calcio (Izquierdo, 2008).

La vitamina D actúa principalmente a nivel intestinal, pues favorece la absorción de calcio dietético; además, en el hueso actúa en conjunto con la PTH activando la diferenciación de los osteoclastos y en consecuencia, estimula la resorción ósea lo que hace posible una correcta mineralización. Es por esta razón, que ante una deficiencia de vitamina D_3 , como es el caso en

mujeres postmenopáusicas, se eleva el riesgo de hiperparatiroidismo secundario, esto para mantener los niveles normales de calcio, así como la pérdida asociada de masa ósea (Ayus, Tejedor, & Caramelo, 2007).

En cuanto a la hormona de crecimiento, ésta se sintetiza tanto en la hipófisis como en otras células del cuerpo, una de ellas son los osteoblastos. Es por esta razón que se considera que posee efectos endócrinos y parácrinos (Neyro-Bilbao et al., 2011). Esta hormona actúa directamente sobre los receptores de los osteoblastos, estimulando la actividad de estos, con un consecuente aumento de la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina (Nolla-Solé, 1997).

Las hormonas tiroideas son hipercalcemiantes al igual que la PTH. Realizan su acción a nivel de hueso, en donde estimulan a los osteoclastos, que a su vez aceleran la velocidad del recambio óseo. De esta manera, el hipertiroidismo es factor de riesgo de osteoporosis (Riancho & Gutiérrez, 2003).

Los glucocorticoides actúan de manera fisiológica como reguladores del remodelamiento óseo, ya que tanto las células osteoclásticas como osteoblásticas, poseen receptores específicos para glucocorticoides. Éstos actúan sobre las células del linaje osteoblástico, inhibiendo la replicación de sus precursores, favoreciendo la apoptosis, así como niveles bajos de osteocalcina y además, incrementan la reabsorción ósea (Negri, Spivacow, & Zanchetta, 1992).

Las hormonas sexuales, particularmente los estrógenos, actúan directamente sobre los osteoblastos regulando su proliferación y diferenciación, además, aumenta la secreción de citoquinas. Así mismo, los estrógenos actúan de forma parácrina estimulando o inhibiendo la actividad de los osteoclastos. Además, estas hormonas pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), una proteína que inhibe la resorción ósea ocasionada por los osteoclastos, regulando así la osteoclastogénesis. De manera que con lo

anterior se explica la pérdida de hueso en presencia de hipoestrogenismo en la menopausia (Neyro-Bilbao et al., 2011).

Por otra parte, los andrógenos poseen un efecto anabólico, por lo que facilitan la acción de los osteoblastos e inhibiendo la resorción ósea pues disminuyen la secreción de citoquinas (López-Chicharro & López-Mojares, 2008).

Finalmente la leptina, hormona asociada a la regulación hipotalámica del apetito y del balance energético, es sintetizada a partir del gen *LEP*. A esta hormona se le atribuyen funciones relacionadas a la masa ósea, ya que participa en cuatro mecanismos específicos: 1) la leptina participa en la regulación de la masa corporal, y niveles bajos de masa corporal se relacionan con baja masa ósea. 2) La menarquia tardía se considera como factor de riesgo para osteoporosis; ya que la leptina comunica al sistema nervioso central la cantidad de grasa que posee el cuerpo, necesaria para iniciar este proceso, tiene una participación directa en los mecanismos del desarrollo puberal y en el mantenimiento de la menstruación. 3) Cuando se presenta amenorrea en deportistas, asociado a bajos niveles de estrógenos y disminución de masa ósea, estos efectos son revertidos si se administra leptina. 4) Esta hormona regula la producción de estrógenos, que actúan directamente sobre el metabolismo óseo (Márquez-Rosa & Garatachea-Vallejo, 2009).

3.4 Regulación del metabolismo ósea por vías de señalización

En los adultos, tanto el desarrollo del esqueleto, como la remodelación y resorción de éste, están regulados por una red de vías de señalización (Canalis, Giustina & Bilezikian, 2007).

Para mantener la estructura y función del hueso, las actividades de los condrocitos y osteoblastos, procedentes de las células madre mesenquimales (MSC), junto con los osteoclastos hematopoyéticos que participan en la reabsorción del hueso, deben existir en un equilibrio dinámico. Si este equilibrio se altera puede dar como resultado osteoporosis u osteopetrosis (aumento

anormal de la densidad de los huesos) (Lin & Hankensosn, 2011). Para mantener la homeostasis ósea existen diferentes vías de señalización que promueven la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las MSC, tal es el caso de las vías de señalización canónica Wnt y Notch (Jeorger & Gnant, 2012).

3.4.1 Wnt, vía de señalización involucrada en la homeostasis ósea

La vía de señalización Wnt (*wingless*) está involucrada en la regulación de la diferenciación de adipocitos, osteoblastos y condrocitos a partir de células madre. La familia de ligandos Wnt, son un grupo de glucoproteínas muy conservadas (Davis & Nieden, 2008). La vía de señalización Wnt canónica (se diferencia de la vía Wnt no canónica por la acumulación de β -catenina), es la más conocida, posee los siguientes componentes:

- a) Receptores de membrana: están compuestos por proteínas *frizzled* y por co-receptores LRP5 y LRP6 (péptido receptor de lipoproteína relacionada).
- b) Ligandos Wnt: estas glucoproteínas hidrofóbicas se unen a los receptores y activan la vía. Actualmente se han identificado 19 ligandos.
- c) Efectores intracelulares: como la axina, la proteína de la enfermedad de la poliposis adenomatosa del colon (APC), la β -catenina y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3: fosforila a la β -catenina lo que facilita su unión a la ubiquitina para posteriormente ser degradada en los proteosomas).
- d) Antagonistas: son moléculas que inhiben la cascada de señalización Wnt como algunas proteínas solubles *frizzled* que se unen a los ligandos y compiten por fijarse al receptor. La esclerostina (codificada por *SOST* y expresada en los osteocitos) se fija a LRP5 y/o 6, bloqueando la formación del complejo LRP5/6-*frizzled*-Wnt.

Cuando la vía Wnt no está activada (Figura 5), se forma un complejo axina-APC-GSK3 manteniendo niveles bajos de β -catenina en el citoplasma, debido a la fosforilación de ésta por GSK3. Cuando los ligandos Wnt se unen a los

receptores, el complejo axina-APC-GSK3 se rompe, disminuyendo la actividad de GSK3, esto ocasiona la disminución de la degradación de β -catenina, acumulándose en el citoplasma, posteriormente es translocada al núcleo, activando factores de transcripción como Tcf-Lef1 (Factor derivado de células T/Factor de unión al potenciador linfoide 1) (Velasco & Riancho, 2008).

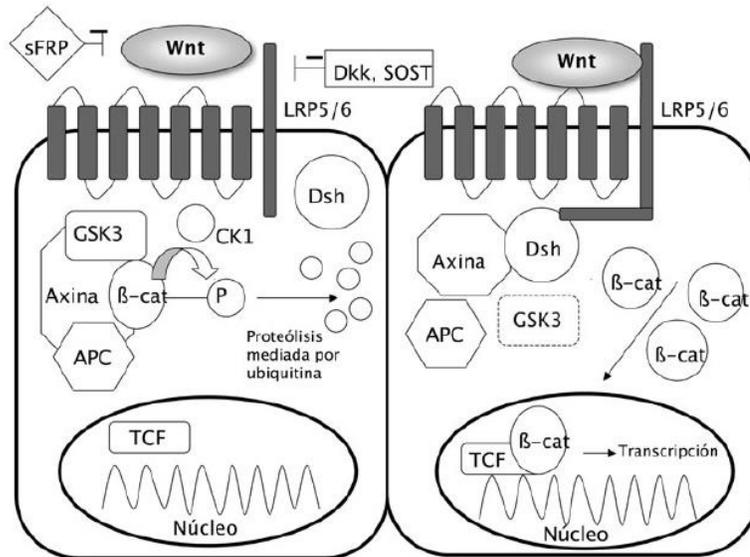


Figura 5. Vía de señalización Wnt canónica. Cuando los ligandos Wnt no se unen a su receptor, no se transcriben ya que la β -catenina se degrada (izquierda). Al activarse la vía hay menor degradación de β -catenina, acumulándose en el citoplasma, ingresa al núcleo en donde activa factores de transcripción (derecha). APC: proteína de la poliposis adenomatosa del colon; cK: caseína-cinasa; Dsh: dishevelled; sFRP: proteína soluble similar a frizzled (Tomado de Velasco & Riancho, 2008).

La activación de la vía Wnt beneficia la diferenciación de los precursores osteoblásticos por medio de la inducción de factores de transcripción como *Runx2* (Gaur et al., 2005). Por otra parte, la vía Wnt también induce la producción de osteoprotegerina (OPG) por los osteoblastos, lo que incrementa la relación OPG/RANKL reduciendo la diferenciación de osteoclastos y por consiguiente, la resorción ósea (Escobar-Gómez, Jódar & Hawkins, 2009).

3.4.2 Participación de la vía de señalización Notch en la homeostasis ósea

La vía de señalización Notch juega un papel central en el desarrollo del esqueleto y en el remodelado óseo ya que regula la diferenciación de células óseas (Acton, 2013).

La vía Notch es una familia de receptores (proteínas transmembrana) evolutivamente conservados que se activan por contacto directo con sus ligandos y determinan el destino celular (Bai et al., 2008). En mamíferos, existen cuatro receptores Notch (nombrados por numeración, Notch1-4) y doce ligandos agrupados en cuatro clases: a) Delta/Serrate/LAG-2 (DSL), Delta y proteínas Oncostantina-11-like (DOS) que contienen ligandos Delta-like1 (DLL1), Jagged1 (Jag1) y Jag2; b) sólo ligandos DSL (DLL3 y DLL4); c) co-ligandos de DOS (DLK1 y DLK2); d) ligandos no canónicos (DRNA, MAGP1, MAGP2, F3/Contactina1 y NB-3/Contactina6 (Thakker et al., 2013).

Para mantener la homeostasis ósea, la vía Notch (Figura 6) mantiene a las células madre mesenquimales en un estado indiferenciado por la represión de *Runx2* (factor de transcripción, que codifica para la proteína conocida como factor de unión central subunidad alfa-1 [CBF-alfa-1]), lo que evita la diferenciación a osteoblastos. El papel inhibitorio de Notch de los osteoblastos está regulado por el gen *NFATc1* (Factor nuclear de células T activadas, citoplásmico 1) y por la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina. En el caso contrario, un incremento de la función de la vía Notch ocasiona la diferenciación de las células mesenquimales a preosteoblastos inmaduros (Pre-Ob) y posteriormente a osteoblastos por la transcripción de *OSX* (osterix) (Barbuto & Mitchell, 2013), *ciclina D* y *ciclina E* (Chen, Lee & Bae, 2013).

Además de participar en la osteoblastogénesis, la vía Notch también regula la osteoclastogénesis de forma celular no autónoma por medio de la expresión de *Opg* (codifica para la osteoprotegerina) por los osteoblastos *in vivo*. La osteoprotegerina interviene como un receptor soluble para el RANKL, obstruyendo la interacción entre el RANKL y su receptor RANK (Zanotti &

Canalis, 2012). Otra manera de reprimir la osteoclastogénesis es llevada a cabo por las células autónomas de la vía Notch en los preosteoclastos (Pre-OCS). En el microambiente del hueso, los osteoblastos actúan como células de señalización por medio de la expresión de *JAG1* que activa la señalización *Notch1* en las células hematopoyéticas (HSCs), lo que ocasiona un incremento de la población de estas células (Nobta, et al., 2005).

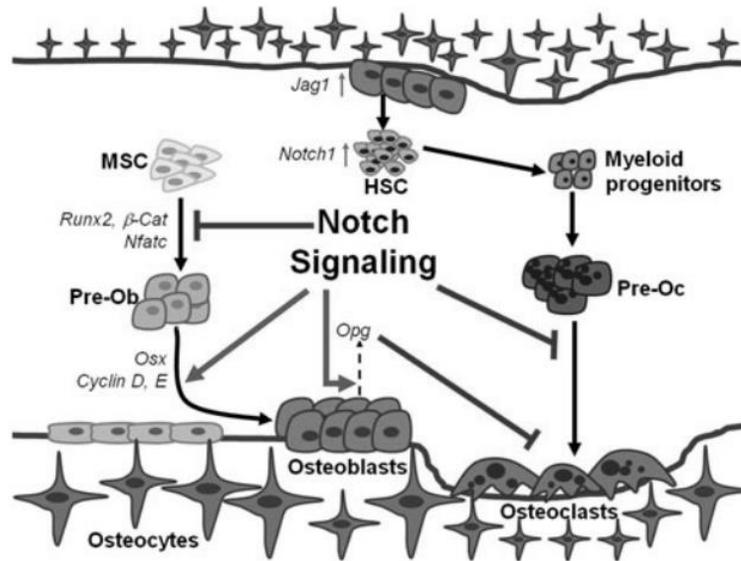


Figura 6. Señalización Notch en la homeostasis ósea. Representación gráfica de la vía de señalización Notch (Tomado de Chen, Lee & Bae, 2013).

3.5 Determinación de la DMO

A pesar de los factores que influyen en el metabolismo óseo, es evidente que la finalidad de éste es el mantenimiento de la masa ósea, esto se refiere a que la cantidad de hueso que forman los osteoblastos, debe ser igual a la que es destruida por los osteoclastos. Para un adecuado funcionamiento, el esqueleto humano debe ser duro y a la vez lo suficientemente flexible para que pueda deformarse sin romperse. Cuando ocurre un balance óseo negativo, es decir, cuando la cantidad de hueso formado es menor que la del hueso que se destruye, disminuye la masa ósea. Y al disminuir la masa ósea se pueden

ocasionar fallas estructurales como microfracturas o fracturas completas de los huesos (López-Chicharro & López-Mojares, 2008).

Lo anterior deja claro que la resistencia del hueso está determinada por la composición del material que forma el hueso, además de la cantidad y calidad de la masa ósea formada. La cantidad ósea se compone de la densidad mineral ósea, así como del tamaño del hueso, y estos pueden ser medidos a través de la densitometría (DXA). La DMO medida por densitometría tiene un alto valor predictivo de riesgo de fracturas y es muy utilizado para diagnosticar osteoporosis. El punto de corte del T-score para diagnosticar osteoporosis propuesto por la OMS es de -2.5 DE (Desviaciones estándar), mientras que valores entre -1 y -2.5 DE se clasifican como osteopenia y valores ≥ 1 DE se consideran normales (Hough et al., 2010).

A pesar de que existe la clasificación de osteoporosis de acuerdo a la DMO, no necesariamente indica que una mujer que haya sido diagnosticada con osteoporosis va a sufrir fracturas, ni que todas las fracturas ocurren en mujeres osteoporóticas. Esto sucede por factores que, independientemente de la densidad mineral ósea, predisponen al riesgo de fractura. Uno de estos factores es la edad, ya que para una determinada DMO, el riesgo de sufrir fracturas aumenta en personas mayores (Fitzgerald et al., 2004).

Además de la edad, existen otros factores que pueden ser modificados, como es el caso de la falta de exposición al sol, que podría ocasionar deficiencia de vitamina D. Otros determinantes del riesgo de fracturas son el bajo peso corporal, la falta o poca actividad física (la debilidad muscular favorece las caídas), fumar y el consumo elevado de alcohol (Roman-García, Garcés-Puentes, & Díaz-Curiel, 2002).

3.6 Factores genéticos como factor de susceptibilidad: polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

La densidad mineral ósea puede verse afectada no solamente por factores ambientales y hormonales, sino también factores genéticos. Los genes han sido ampliamente asociados con la variación de la DMO, la calidad de la microarquitectura ósea, la aparición de osteoporosis y/o el riesgo de fracturas, que es un rasgo de alta heredabilidad, estimado entre el 60 y 85% (Ng et al., 2006). Una de las herramientas que se utiliza para determinar la influencia genética sobre la DMO son los análisis de polimorfismos (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

Los polimorfismos genéticos, de acuerdo con Lorenzo et al. (2009), son las *“variaciones en la estructura primaria de la secuencia de nucleótidos en el DNA, que pueden dar lugar a la modificación de los niveles de expresión de los genes o a variaciones funcionales de la proteína codificada”*.

Existen varios tipos de polimorfismos: inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas, pero los más frecuentes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*). Actualmente, los SNPs son los más utilizados como marcadores genéticos. Estos SNPs se ubican en una posición específica del genoma, en el que los miembros individuales de una misma especie difieren en un solo par de bases. Para ser considerado SNP, su frecuencia en la población debe ser mayor al 1% (Pierce, 2010).

La mayoría de los SNPs poseen dos alelos representados por una sustitución de base por otra. Estos alelos, en las poblaciones se clasifican como alelo mayor o “silvestre” y como alelo menor, dicha clasificación se basa en la frecuencia observada en las poblaciones. Ya que los humanos son diploides, un sujeto puede poseer uno de tres genotipos: 1) homocigoto para el alelo más frecuente, 2) heterocigoto y 3) homocigoto para el alelo de menor frecuencia. A la fecha, se han registrado más de 10 millones de variaciones en la secuencia

de ADN y se detalla que los SNPs se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano (Checa-Caratachea, 2007).

Existen diferentes tipos de SNPs, los conocidos como “no sinónimos” que pueden estar presentes en regiones codificantes y ocasionar un cambio en un aminoácido, afectando directamente la función de la proteína. Además, existen variaciones funcionales que pueden provocar alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta. Estas variaciones pueden localizarse en la región promotora del gen, de manera que influyen la actividad transcripcional del gen, modulando la unión de factores de transcripción; pueden localizarse en intrones, regulando la estabilidad de la proteína; en sitios de eliminación de intrones y unión de exones (*splicing*) o en regiones intragénicas. Cuando los SNPs no alteran la conformación del gen se les conoce como “sinónimos” o silenciosos (Checa-Caratachea, 2007).

Otra clasificación de los SNPs es en base a su localización en el genoma: iSNP, se localizan en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras y gSNP si se sitúan en regiones intragenómicas. Los SNPs localizados en regiones codificantes (cSNP) se pueden representar como SNPs sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (Checa-Caratachea, 2007).

Los SNPs surgen a partir de una mutación, estos se heredan en variantes alélicas, sin embargo, no suelen producir diferencias fenotípicas. Cuando se presenta un grupo específico de SNPs, así como de otras variaciones genéticas en un mismo cromosoma o en otra región de éste, se le denomina haplotipo. Ya que los SNPs ubicados dentro de un haplotipo están físicamente ligados, generalmente se heredan juntos (Pierce, 2010).

El estudio de polimorfismos tiene muchas aplicaciones en el campo de la medicina e investigación, ya que pueden ser usados como marcadores de ciertas enfermedades, es decir, la presencia de algunos polimorfismos pueden ser causales de riesgo para el desarrollo o progresión de cierta enfermedad.

Por esta razón, los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades (Pierce, 2010).

3.7 Genética de la osteoporosis

Como se describió en la sección anterior, los genes son uno de los factores que recientemente se han relacionado con la variación de la DMO, riesgo de fracturas y osteoporosis. Uno de los primeros genes en ser asociados con la DMO, fue el gen *VDR* que codifica para el receptor de la vitamina D. Este gen se localiza en tejidos implicados en la homeostasis ósea como el intestino, el riñón y la paratiroides. El receptor de la vitamina D es necesario para que dicha vitamina se introduzca en las células y participe como factor de transcripción en la síntesis de proteínas que permiten la adecuada absorción de calcio, además de favorecer la mineralización de la matriz ósea. Morrison et al. (1994) fueron los primeros en reportar dicha asociación. En este gen se localizan varios polimorfismos, principalmente el polimorfismo *TaqI* que ha sido asociado con la pérdida acelerada de DMO y presencia de fracturas en mujeres postmenopáusicas (Zajickova, Zofkova, Bahbouh, & Krepelova, 2002).

Otro gen implicado en el metabolismo óseo es el gen *MTHFR* que codifica para la proteína metiltetrahidrofolato reductasa, que desde la investigación realizada por Miyao et al. (2000), ha sido ampliamente estudiado y asociado como gen candidato para el desarrollo de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. Este gen se encuentra en la región 1p36 del cromosoma 1, y se encarga de catalizar la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (Van-Meurs et al., 2004). El polimorfismo C677T ha sido identificado como el polimorfismo funcional del gen *MTHFR*, ya que la variante del alelo T que genera un codón que codifica para valina posee menor actividad que el alelo C, alelo que codifica para alanina. Cuando se presenta una deficiencia de *MTHFR* puede ocasionar hiperhomocisteinemia por la falta del 5-metiltetrahidrofolato; siendo el genotipo TT el que se asocia con incremento de homocisteína. Cuando se presentan niveles elevados de homocisteína plasmática, se incrementa el riesgo de fractura osteoporótica (Li & Wu, 2010).

Recientemente se han identificado ciertos genes que se asocian con la DMO debido a su participación en el recambio óseo y la relación que tienen con la presencia de osteoporosis. Uno de estos genes es *MEF2C* o factor promotor de miocitos 2C, éste gen codifica para una proteína del mismo nombre, que regula la expresión de la esclerostina (*SOST*), que a su vez regula la actividad osteoblástica (Gifre et al., 2013).

Otro gen involucrado en el metabolismo óseo es *JAG1* que codifica para la proteína Jagged-1, la cual, de acuerdo a una investigación reciente, induce la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales a través de la vía de señalización Notch (Zhu, Sweetwyne & Hankenson, 2013).

Por otro lado, se ha señalado al gen *BDNF* como candidato a la regulación de la masa ósea, de acuerdo con Camerino et al. (2012), este gen puede jugar un papel fisiológico en la homeostasis ósea, pues al suprimir *BDNF* en el cerebro de ratones se produce un fenotipo metabólico de obesidad, hiperfagia y leptina elevada, observándose un incremento de la masa ósea.

3.7.1 Participación del gen *MEF2C* en la diferenciación de células óseas

En mamíferos, MEF2, son un grupo de proteínas conservadas evolutivamente que pertenecen a la familia MADS box-2 (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF) (Genetics Home Reference, 2014). Contienen factores de transcripción compuesto por cuatro miembros: Mef2a, Mef2b, Mef2c y Mef2d (Potthoff & Olson, 2007).

El factor promotor de miocitos 2C (*MEF2C*) es un factor de transcripción codificado por el gen *MEF2C*. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, en la región 14.3 (5q14.3), de la par de base (pb) 88,718,241 a la pb 88,904,105 (Figura 7) (National Center for Biotechnology Information, 2014b).

En un estudio reciente, se identificó al gen *MEF2C* como uno de los 20 locus asociados con densidad mineral ósea (Rivadeneira et al., 2009). Esto debido a que *MEF2C*, es miembro de la vía de señalización Wnt que está involucrado en

la regulación de la expresión de *SOST* (inhibidor de la formación ósea osteoblástica). *MEF2C* activa a *SOST*, que codifica para la proteína esclerostina, ésta se une a los receptores de membrana LRP-5 y 6, lo que inhibe la activación de la vía Wnt, y por consecuencia la actividad osteoblástica (Monroe et al., 2012).

En el gen *MEF2C* se han descrito tres SNPs (rs1366594, rs11951031 y rs12521522) que se han encontrado asociados con variaciones en la DMO en diferentes regiones óseas como cuello femoral, espina lumbar, cadera y antebrazo, en diferentes poblaciones (Figura 7) (Zheng et al., 2013).

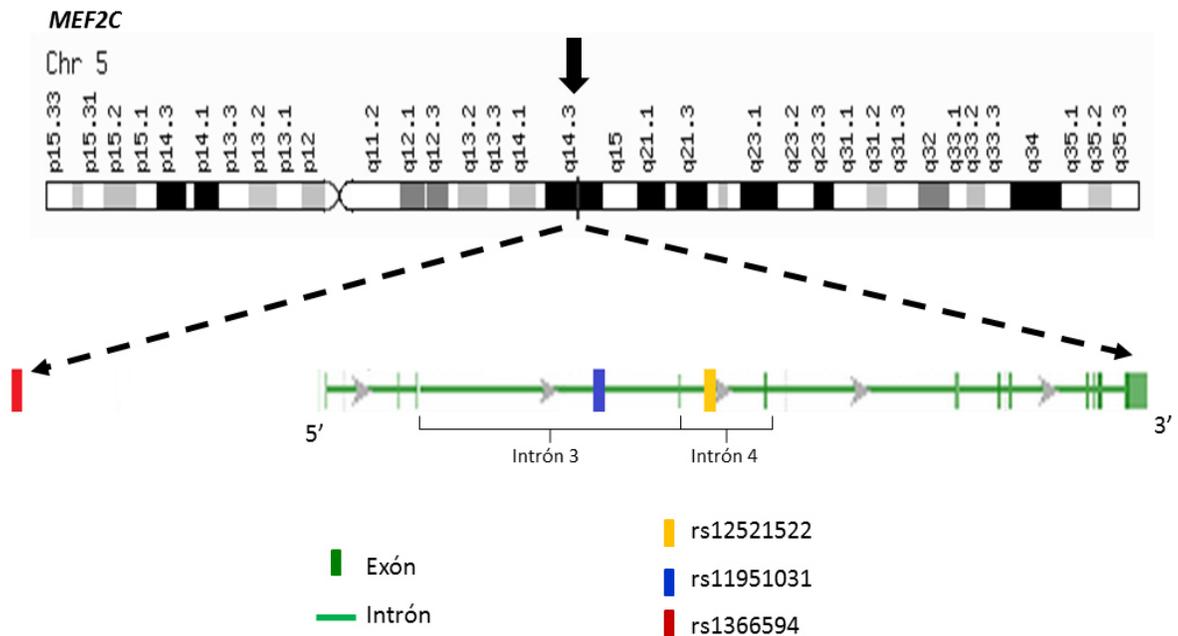


Figura 7. Localización genómica de *MEF2C* y polimorfismos asociados con DMO. La región marcada con la flecha indica la localización del gen *MEF2C*. En la parte inferior se ubican los polimorfismos rs1366594 (localizado hacia el extremo 5'), rs11951031 (intrón 3) y rs12521522 (intrón 4) (Tomado de Weizmann Institute of Science, 2013c; National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2014e).

3.7.2 El gen *JAG1* gen involucrado en la diferenciación de células óseas

La glucoproteína Jagged-1 (*Jag1*) codificada por el gen *JAG1*, es uno de los ligandos de los receptores Notch en las membranas celulares de mamíferos, pertenece al dominio de la familia Delta/Serrate (DSL) (Nobta, et al., 2005; Genetics Home Reference, 2010).

El gen *JAG1* está conformado por 36,362 pares de bases (pb) de DNA genómico, se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 20, entre las regiones 12.1 y 11.23 (Figura 8), más precisamente, de la pb 10,637,684 a la pb 10,674,046 (National Center for Biotechnology Information, 2014a).

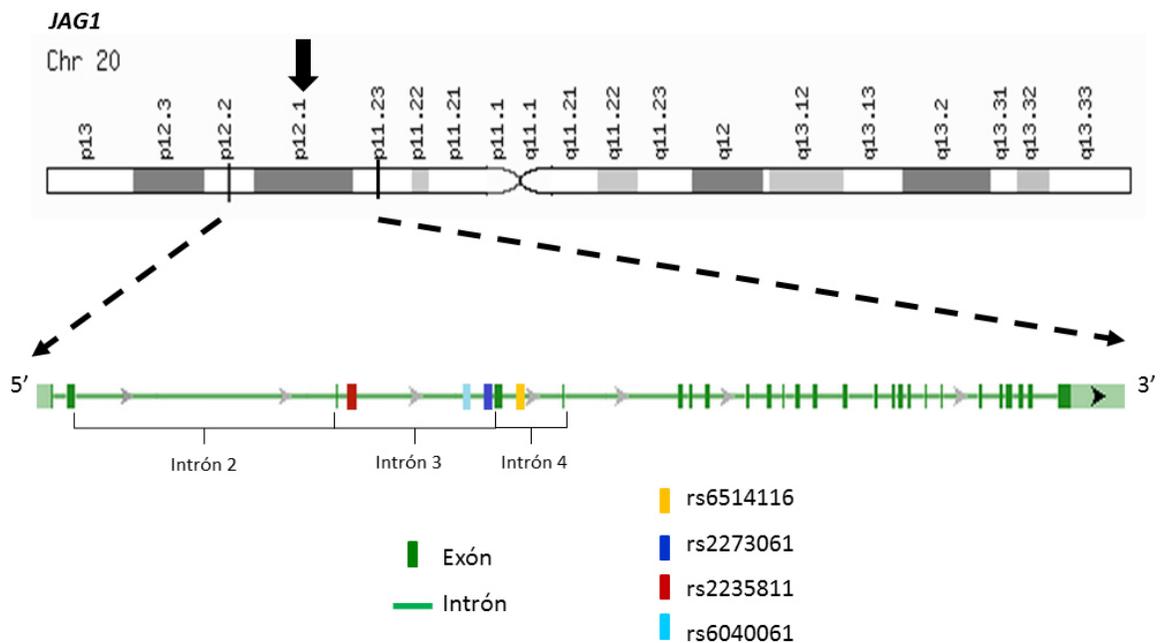


Figura 8. Localización genómica de *JAG1* y polimorfismos asociados con DMO. La región marcada con la flecha indica la localización del gen *JAG1*. En la parte inferior se ubican los SNPs rs2235811, rs6040061 y rs 2273061 en el intrón 3, mientras que el SNP rs6514116 se localiza en el intrón 4 (Tomado de Weizmann Institute of Science, 2013b; NCBI, 2014d).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el gen *JAG1* se expresa en diferentes tejidos, en las células osteoblásticas este gen se expresa durante la regeneración del hueso y su activación se asocia con un incremento de la deposición mineral ósea (Nobta et al., 2005). Así mismo, investigaciones recientes han señalado que los polimorfismos rs6514116, rs2273061,

rs2235811 y rs6040061 de *JAG1* (Figura 8) se asocian con variaciones en la DMO en población europea y asiática (Kung et al., 2010). Sin embargo, se observaron resultados contradictorios en mujeres de origen étnico México-mestizo (Distrito Federal, México) (Rojano-Mejía et al., 2013).

Al establecerse la conexión entre Jagged-1 y el receptor Notch1 de la vía de señalización Notch en la superficie de las células madre mesenquimales, se inician una serie de reacciones de señalización. Esto ocasiona la escisión proteolítica de la membrana del dominio intracelular de Notch (NICD) por la γ -secretasa (Figura 9) y se transloca al núcleo en donde recluta otros coactivadores para formar complejos y activar el factor de transcripción CSL (CBF-1). CSL recluta al co-activador transcripcional Mastermind-like (MAML), lo que inicia la transcripción de genes diana como el potenciador de división Hairy-1 (*Hes-1*) y Hairy Ears (*Hey*). Esto ocasiona la inhibición de *Runx2*, factor de transcripción esencial para la diferenciación a osteoblastos (Sekine et al., 2012).

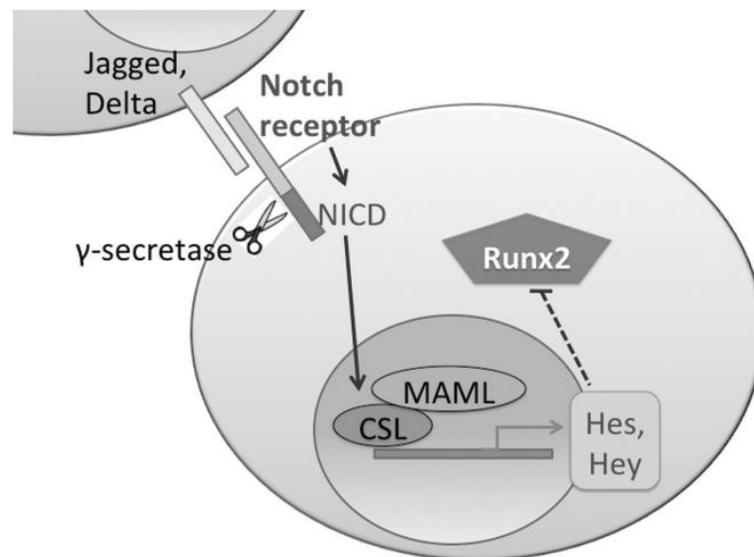


Figura 9. Interacción entre Jagged1 y la vía de señalización Notch. Los ligandos de las células vecinas (Jagged1) interactúan con el receptor Notch, lo que inicia la división mediada por γ -secretasa, liberando al NICD, que posteriormente se une a CSL y MAML para la transcripción de genes como *Hes-1* y *Hey* inhibiendo a *Runx2* (Tomado de Lin & Hankenson, 2011).

3.7.3 *BDNF* gen involucrado en el metabolismo óseo

La proteína BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) localizada en el cerebro y la médula espinal, es miembro de la familia del factor de crecimiento nervioso, promueve la supervivencia de las neuronas ya que participa en el crecimiento, maduración (diferenciación) y en el mantenimiento de estas células. Estudios previos demuestran que BDNF también desempeña una función en condrocitos y osteoblastos, participa en el desarrollo del cartílago, en la osificación y osteoclastogénesis, además juega un papel importante en el desarrollo, crecimiento, remodelado y regeneración ósea (Yamashiro et al., 2001; Hutchinson, Bassett & White, 2010).

La proteína BDNF es codificada por el gen del mismo nombre *BDNF*, que posee un importante papel a través de la evolución (se encuentra conservado en chimpancé, perro, vaca, ratón, rata y gallina). Éste se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 en la región 11p14.1, de la pb 27,654,892 a la pb 27,722,057 (Figura 10) (Genetics Home Reference, 2013).

La proteína BDNF activa la sinapsis (conexiones) entre las células nerviosas, contribuye a regular la plasticidad sináptica, es decir, la sinapsis con el tiempo puede cambiar y adaptarse en respuesta a la experiencia. Esta proteína se localiza en regiones del cerebro que controlan el comer, beber y el peso corporal; además, se le ha relacionado con desordenes neuropsiquiátricos como bipolaridad, trastornos alimenticios y obesidad (Manji & Zarate, 2011).

Por otro lado, el gen *BDNF* al expresarse en otros tejidos como hueso, cartílago, corazón, bazo, placenta y riñón, podría estar involucrado en otros procesos patológicos (Kajiyama et al., 2008). En un meta-análisis realizado por Estrada et al. (2012) en 32,961 individuos se identificó este gen como un candidato en la variación de la DMO. Por otro lado, el SNP rs6265 del gen *BDNF* (Figura 10), caracterizado por el cambio de base GA que genera dos isoformas de la proteína BDNF, una con residuo de aminoácido valina y otra de metionina. Los hallazgos sugieren que el alelo de menor frecuencia (A) se

asocia con una DMO baja. De acuerdo con Deng et al. (2013), se han encontrado asociaciones con el SNP rs6265 y variaciones de la DMO en población caucásica y china.

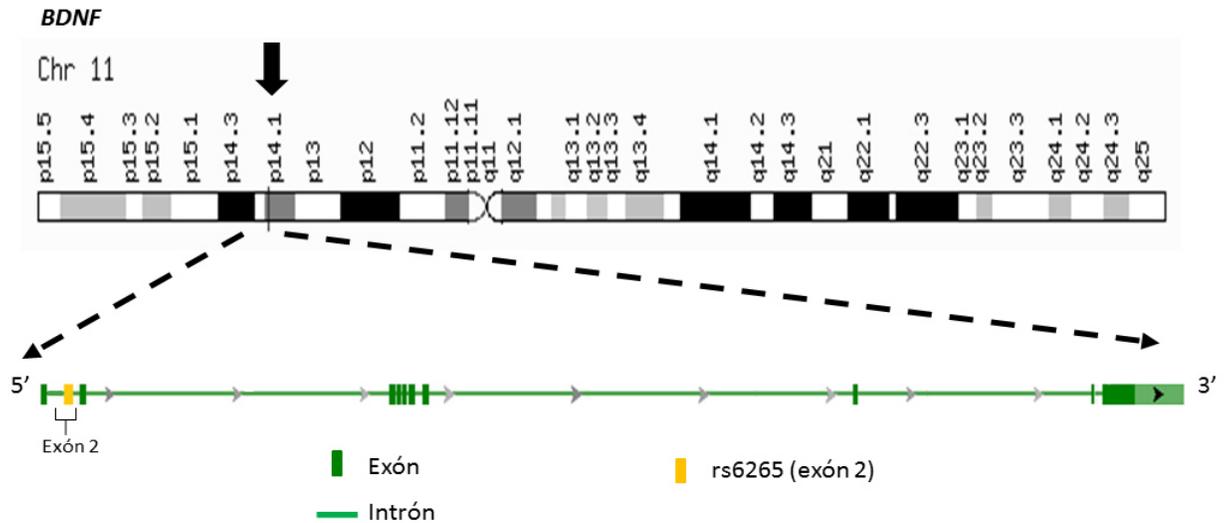


Figura 10. Localización genómica de *BDNF* y del polimorfismo rs6265. La región marcada con la flecha indica la localización del gen *BDNF*. En la parte inferior se localiza el SNP rs6265 ubicado en el intrón 2 (Tomado de Weizmann Institute of Science, 2013a; NCBI, 2014c).

4. JUSTIFICACIÓN

La Op es un problema de salud global, esta enfermedad esquelética sistémica se caracteriza por una baja masa ósea y por el desgaste de la microarquitectura del tejido óseo, además, su importancia se incrementa con el envejecimiento de la población (Muñoz-Torres et al., 2010).

De acuerdo con la IOF (2012), actualmente, y debido a que el riesgo de desarrollar Op aumenta con la edad, las estadísticas reflejan que en América Latina, el porcentaje de personas mayores de 50 años se ubica en el rango del 13 y 29% y para el año 2050, se estima un incremento de estas cifras al 28 y 49%. Mientras que el aumento en el porcentaje de personas de 70 años o más entre 2011 y 2050 alcanzará un promedio de 280%.

En México, la población mayor de 60 años actualmente asciende a 10,7 millones y aumentará a 36,4 millones para el año 2050. En ese momento, la expectativa de vida promedio será de 82 años. Dado que las fracturas osteoporóticas y por fragilidad son enfermedades asociadas con el envejecimiento, es de esperarse que su incidencia crezca de manera conjunta (IOF, 2012).

La situación actual en México, refleja que en nuestro país el 17% de las mujeres mayores de 50 años presenta Op, mientras que solo el 9% de los hombres tiene este mismo padecimiento (Clark et al., 2010). Por otro lado, los costos que representa la Op para los sistemas de salud pública debido a los recursos y cuidados necesarios de los pacientes, así como la atención en los centros de salud, son bastante elevados. En el 2006, los costos por tratamientos de fractura de cadera en México fueron de poco más de \$97 millones de dólares, con un costo individual por evento de \$4,365.50 dólares (Clark et al., 2010).

La baja DMO, así como el mayor riesgo del género femenino, son algunos de los factores que condicionan la aparición de Op. Sin embargo, existen otra serie de factores como la presencia de antecedentes familiares de Op, un bajo

peso, el sedentarismo, el consumo de alcohol y tabaco, factores hormonales (por ejemplo, una menopausia precoz), nutricionales (bajo consumo de calcio y vitamina D), el consumo de medicamentos y algunas enfermedades endócrinas (por ejemplo el hipertiroidismo).

Aunado a estos factores, en la actualidad se ha encontrado que los factores genéticos podrían tener implicación en el desarrollo de la Op. Estudios recientes de asociación del genoma completo (GWAS) y meta-análisis han postulado a los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* como candidatos a la disminución de la DMO, debido a que la presencia de ciertos SNPs localizados en ellos se han asociado con variaciones en la DMO. Sin embargo, se han observado inconsistencias en los resultados en diferentes poblaciones, además, existen muy pocos estudios en la población Mexicana. Por otra parte, los resultados observados en población europea y asiática no pueden extrapolarse a la población mexicana, ya que ésta posee una mezcla de ancestría europea, nativo americana y una pequeña proporción de ancestría africana. Por lo que realizar estudios de asociación en individuos mexicanos permite tener una mejor comprensión del comportamiento de estos polimorfismos en población femenina mexicana, dando la pauta para el desarrollo de terapéuticas preventivas destinadas a las mujeres genéticamente susceptibles.

5. HIPÓTESIS

Existe asociación entre los polimorfismos de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* y la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas de 40 a 80 años.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Analizar la asociación de los polimorfismos de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas de 40 a 80 años del norte del país.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la DMO mediante la absorciometría dual de rayos X en cuerpo total, cadera total (cuello femoral, triángulo de Wards, trocánter) y en espina lumbar (L1-L4 y L2-L4) en mujeres de 40 a 80 años.
- Identificar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de los genes *MEF2C* (rs1366594, rs12521522 y rs11951031), *JAG1* (rs6514116, rs2273061, rs2235811 y rs6040061) y *BDNF* (rs6265) en mujeres de 40 a 80 años.
- Analizar la asociación de los polimorfismos de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* con la DMO en mujeres de 40 a 80 años.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Los reactivos utilizados en los diferentes procedimientos realizados en este estudio fueron obtenidos de diferentes marcas comerciales (Tabla I).

Tabla I. Reactivos utilizados

Marca comercial	Reactivos
Bio-Rad	NaCL, Tris, SDS, EDTA
Research organics	Fenol, Tritón 100X
CTR Scientific	Cloroformo
Bio Basic Inc.	Etanol
Applied Biosystems	TaqMan® Universal Master Mix, 40 x assay
Growcells	Agua destilada libre de DNasa

7.2 Métodos

7.2.1 Diseño del estudio

Este es un estudio exploratorio, transversal, observacional, descriptivo y correlacional, el cual, partió de dos bases de datos de investigaciones previas realizadas por las estudiantes de la Maestría en Ciencias en Nutrición, Lic. Nut. Ninfá Escalante García (2013) y Lic. Nut. Magaly Gómez de la Garza (2013). Se realizó de julio 2013 a julio 2014.

Las unidades de observación fueron mujeres de 40 a 80 años en población abierta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Se utilizó un muestreo no probabilístico, intencional, por factibilidad. La población estudiada cumplió con los siguientes criterios de inclusión: mujeres de 40 a 80 años de edad. Se excluyeron las participantes con enfermedades y/o condiciones que tienen un potencial efecto sobre el metabolismo óseo como trastornos crónicos, enfermedades metabólicas y enfermedades esqueléticas diferentes a la osteoporosis; ejemplo de ellas son la diabetes mellitus tipo 1, enfermedad hepática crónica, artritis reumatoide, fibrosis quística, hipo e hiperparatiroidismo,

hipertiroidismo, hipogonadismo o menopausia precoz (antes de los 40 años). De la misma manera se excluyeron pacientes que utilizaban fármacos que afectan el metabolismo óseo (por ejemplo, terapia de reemplazo de hormonas, corticoides, anabolizantes, medicamentos anticonvulsivos, antirresortivos, etc.), así como mujeres con parentesco familiar (Deng et al., 2002).

La parte experimental de este estudio se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular y en el Laboratorio de Composición Corporal del 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.), así como en el Laboratorio de Genómica de las Enfermedades Cardiovasculares y Óseas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la U.A.N.L. (No. de registro: 14-FaSPyN-SA-07), además se obtuvo el consentimiento informado de todas las participantes en concordancia con Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Secretaría de Salud, 1998).

7.2.2 Estrategia general

Se utilizó una muestra de 124 mujeres, las cuales firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo A) previo a su participación en el estudio. Para el cumplimiento de los objetivos planteados, se diseñó la estrategia observada en la figura 11. Se partió de bases de datos realizadas previamente por las estudiantes de la Maestría en Ciencias en Nutrición, Lic. Nut. Ninfa Escalante García (2013) y Lic. Nut. Magaly Gómez de la Garza (2013), con un total de 229 expedientes, de los cuales se seleccionaron mujeres que cumplieran con los criterios de inclusión, además de tener datos completos sobre DMO en cuerpo total (DMO-CT), cadera total (DMO-C), cuello femoral (DMO-CF), triángulo de Wards (DMO-TW), en columna lumbar anteroposterior L1-L4 (DMO-L1-L4) y L2-L4 (DMO-L2-L4). Las mujeres que cumplieron con todos los criterios pero que en el banco de DNA no se contaba con muestras de DNA o dichas muestras eran de mala calidad, se les llamó para recolectar

nuevamente sangre periférica en tubos con EDTA para extracción de DNA genómico. Los polimorfismos de *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* se determinaron por PCR-TR utilizando sondas TaqMan®.

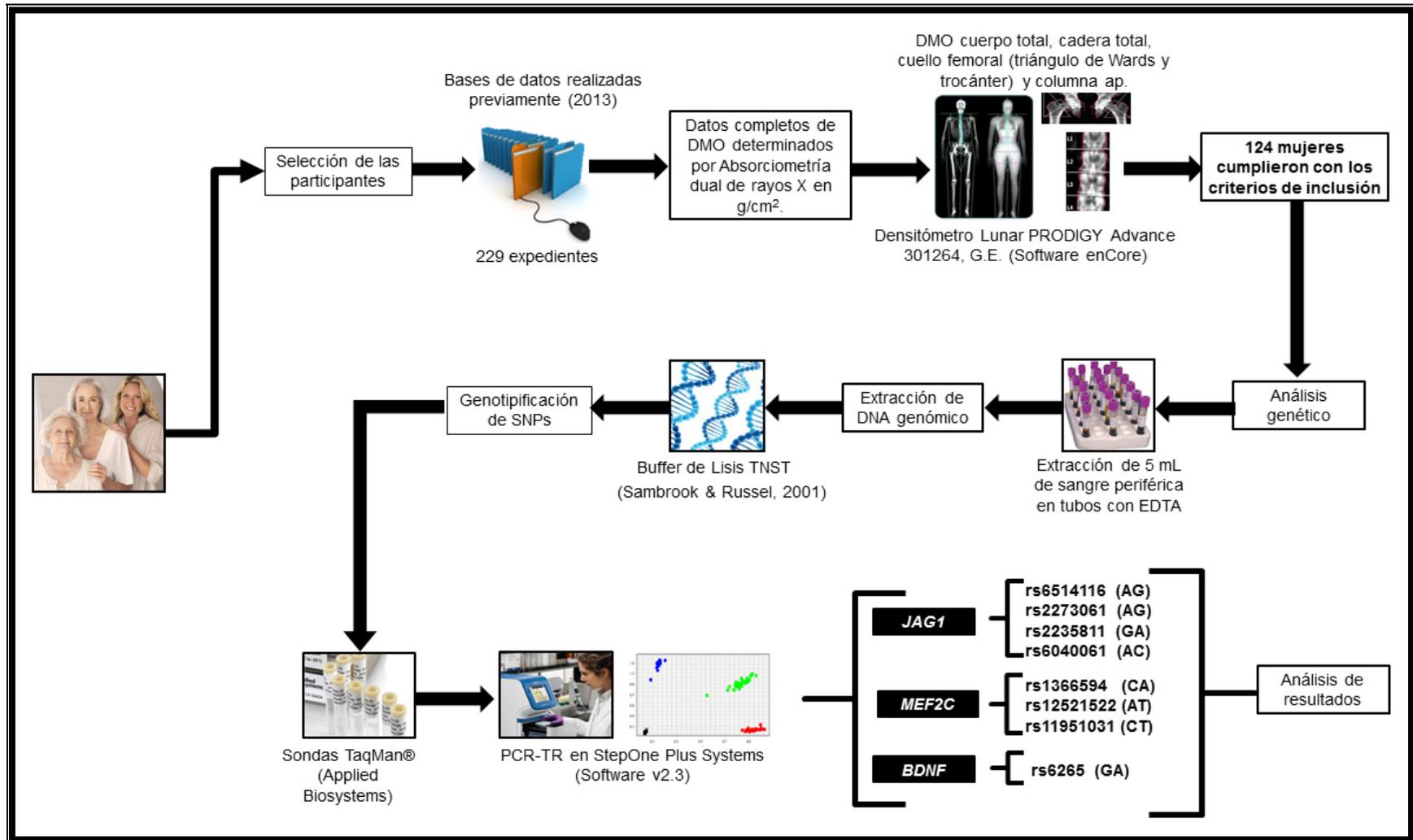


Figura 11. Estrategia general de trabajo.

7.2.3 Obtención de la información

Las participantes fueron seleccionadas y reclutadas a partir de bases de datos realizadas en investigaciones anteriores, incluyendo a las mujeres que cumplieran con los criterios de inclusión y que tuvieran expedientes con datos completos (edad, peso, talla, porcentaje de grasa corporal y mediciones de DMO en cuerpo total, cadera total, cuello femoral y columna lumbar anteroposterior [lumbar 1- lumbar4 y lumbar 2- lumbar 4]).

7.2.4 Densitometría ósea

Los valores de DMO se obtuvieron de los expedientes de las participantes. La técnica para tal determinación se llevó a cabo por el método de absorciometría dual de rayos X utilizando el densitómetro Lunar PRODIGY Advance, modelo 301264, G.E. siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, de acuerdo con las posiciones oficiales de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (Leib, Lewiecki, Binkley, & Hamdy, 2004) descritas a continuación:

Toma de la medición: El sujeto a evaluar debe estar en ayuno de por lo menos 3 horas, así como debe utilizar ropa ajustada (short y blusa ajustada), sin portar nada metálico ni joyería. Se ingresaron los datos del paciente (nombre, peso y talla) al software del equipo.

Determinación de DMO-CT: el sujeto se colocó acostado sobre la plancha del equipo, con la vista al frente, 3 cm abajo de la línea superior indicada en el equipo DXA; posteriormente se acomodó al paciente siguiendo las indicaciones propuestas por el fabricante, se sujetaron las piernas y tobillos con cintas ajustables y se realizó el escaneo.

Medición de DMO-CF: esta medición se realizó en la misma sesión, se colocó al sujeto acostado sobre el equipo, viendo hacia arriba, con las piernas ligeramente separadas y hacia adentro, utilizando el aditamento acolchado del equipo, el cual proporciona soporte a los pies. Las manos se colocaron sobre el

pecho en forma de cruz. Se ubicó el escáner a la mitad de las piernas, a 3 cm de la sínfisis púbica (conexión entre las dos partes del pubis), se corrió el escaneo y se realizó la medición de fémur izquierdo y derecho de igual forma.

Determinación de DMO L1-L4 y L2-L4: se realizó la medición en la misma sesión. Se colocó el sujeto recostado sobre la plancha del equipo, las piernas elevadas, los muslos se posicionaron en un ángulo de 60 a 90 grados, para lo cual se utilizó un bloque de espuma. Esto permite que la pelvis esté lo más horizontal posible, que la parte inferior de la columna vertebral (zona lumbar) esté aplanada y permite separar las vértebras.

7.2.5 Determinaciones genéticas

7.2.5.1 Extracción de sangre

Las muestras de DNA se tomaron del banco de DNA del Laboratorio de Genética y Biología molecular del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL. Sin embargo, de las participantes seleccionadas que no se contaba con sus muestras de DNA o que dichas muestras eran de mala calidad, se les solicitó presentarse con un ayuno de 10 horas para realizar la extracción de sangre periférica mediante punción venosa; se extrajeron 5 ml de sangre en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®) para la extracción de DNA genómico. Este procedimiento se realizó por personal capacitado del CINSP una vez que las participantes firmaron el consentimiento informado.

7.2.5.2 Extracción de DNA genómico

Una vez obtenidas las muestras de sangre, se procedió a la extracción de DNA genómico por el método de buffer de lisis TSNT propuesto por Sambrook y Russell (2001), el cual se modificó con la finalidad de obtener una muestra de DNA de mayor cantidad y calidad. La extracción se realizó del botón leucocitario en lugar de sangre completa como lo indica el procedimiento original. A continuación se describe brevemente: los tubos con las muestras de sangre se

centrifugaron por 15 minutos (min) a 24 °C (centrífuga marca eppendorf, modelo 5804R), posteriormente se extrajo con cuidado el botón leucocitario y se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 ml, se agregaron 300 µL de buffer TSNT (0.06% Tritón X-100, SDS 1%, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris HCl a pH 8) y se mezcló por inversión, se añadieron 200 µL de Fenol y 100 µL de Cloroformo mezclando en vórtex (marca genie 2, modelo G650 Daigger) por 1 min. Posteriormente se agregaron 150 µL de buffer TE 1X mezclando en vórtex por 10 segundos para después centrifugar 11 minutos a 13,200 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga (marca: Eppendorf, modelo 5415D). El sobrenadante se transfirió a otro tubo de polipropileno y se centrifugó 6 min a la misma velocidad, transfiriendo el sobrenadante resultante a otro tubo de polipropileno y se agregó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C por 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó por 11 minutos a 13,200 rpm, se eliminó el sobrenadante por decantación, cuidando no tocar la pastilla blanca (DNA) que se formó en la base del tubo, después se agregaron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 6 minutos a 13,200 rpm, decantando el sobrante. Posteriormente se dejó secar el tubo abierto a temperatura ambiente por 5 minutos, transcurrido este tiempo, el DNA obtenido se resuspendió en 100 µL de agua mQ estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El DNA se cuantificó en el NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) para verificar que las muestras tuvieran una relación de 1.6 a 2.0 en la relación de absorbancia 260/280, lo que indica la pureza del DNA, para esto, se utilizó 1 µL de muestra.

7.2.5.3 Genotipificación de SNPs en genes candidatos

Se seleccionaron ocho SNPs (tabla II) que mostraron asociación con DMO en al menos dos poblaciones (Zheng et al., 2013; Kung et al., 2010; Deng et al., 2013). El análisis de genotipos de los 8 SNPs se llevó a cabo por medio de PCR-TR en el sistema StepOne Plus PCR-RT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Tabla II. SNPs analizados en este estudio.

Gen	Localización del gen	SNP	Cambio de base	Posición en el cromosoma
<i>JAG1</i>	20p12.1 – p11.23	rs6514116	AG	Intrón 4
		rs2273061	AG	Intrón 3
		rs2235811	GA	Intrón 3
		rs6040061	AC	Intrón 3
<i>MEF2C</i>	5q14.3	rs1366594	CA	Hacia el extremo 5'
		rs12521522	AT	Intrón 4
		rs11951031	CT	Intrón 3
<i>BDNF</i>	11p14.1	rs6265	GA	Exón 2

7.2.5.4 PCR tiempo real

En esta técnica los procesos de amplificación y detección se realizan de manera simultánea. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizan sondas marcadas con fluorocromos, dichas sondas son complementarias a una secuencia localizada dentro del fragmento de DNA blanco, el cual esta flanqueado por las secuencias específicas de los iniciadores utilizados para la amplificación de PCR. Las sondas están marcadas con un fluorocromo donador o reportero en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado, mientras que el extremo 3' está marcado con un fluorocromo aceptor (quencher) que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Mientras la sonda permanece intacta, el aceptor inhibe la emisión de fluorescencia del donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptoras deben estar próximas. Durante el proceso de amplificación del DNA blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. La DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*) con actividad de 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, ocasionando la liberación del fluorocromo donador. Ya que las moléculas donadoras y aceptoras están

lejos, la fluorescencia emitida por el donador no es absorbida por el aceptor sino que es captada por el lector. Es decir que, cuando se inicia la PCR, al encontrarse la DNA polimerasa con la sonda, ésta es degradada lo que libera el fluorocromo permitiendo su identificación por el sistema de detección de fluorescencia (figura 12) (Costa, 2004).

Las sondas incrementan su eficiencia ya que poseen una molécula MGB (minor groove binder) en el extremo 3' que incrementa la temperatura de fusión permitiendo utilizar secuencias más cortas, esto fortalece la unión de la sonda. Las sondas se unen primero que los iniciadores a las secuencias de DNA diana, asegurando su degradación al iniciar la PCR. Estas sondas poseen un mayor nivel de especificidad además de favorecer la cercanía entre las moléculas donadoras y aceptoras (Life Technologies Corporation, 2012).

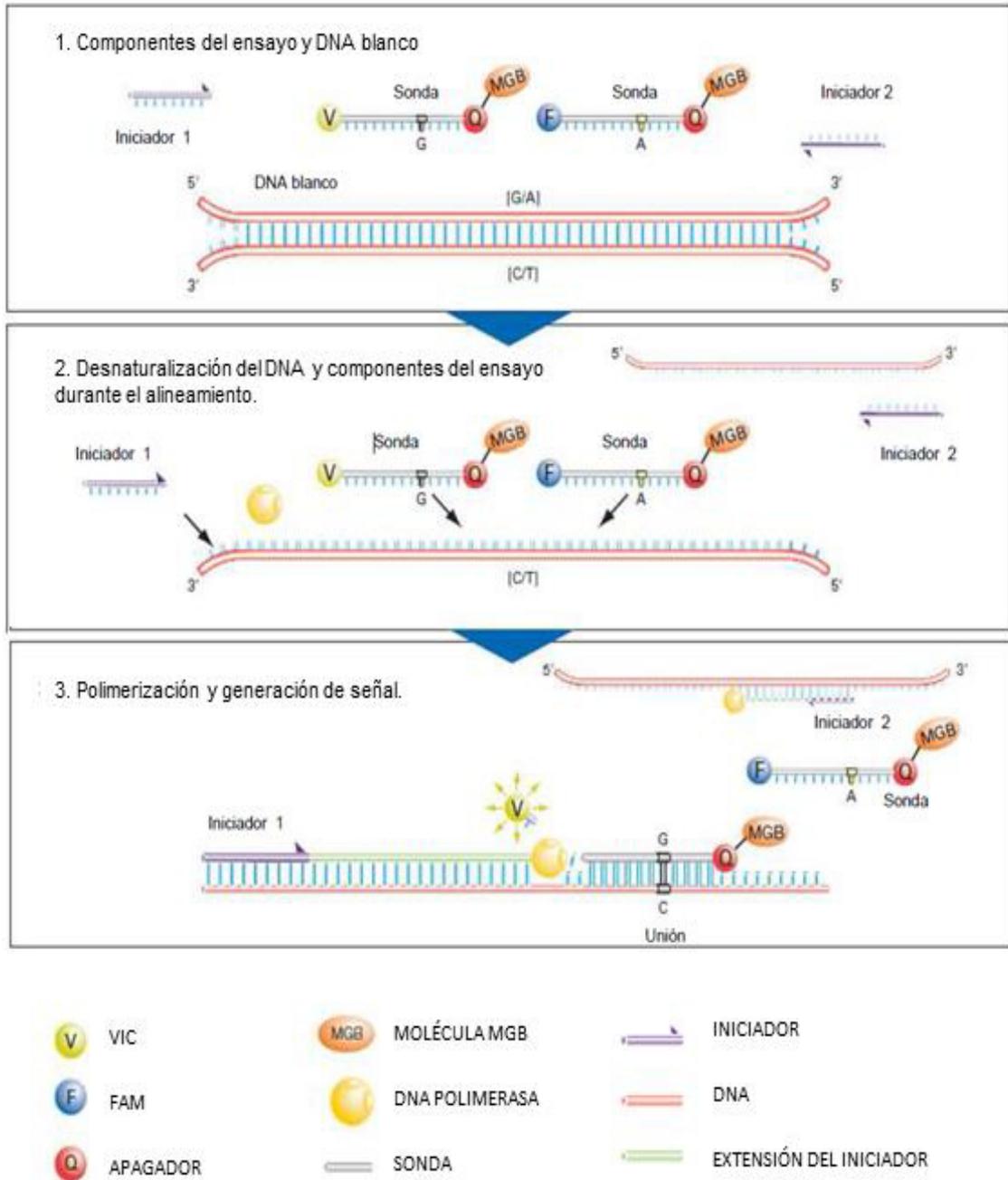


Figura 12. Método de PCR tiempo real utilizando sondas TaqMan. Para que el sistema pueda diferenciar las variantes alélicas, se utilizan dos sondas alelo específicas marcadas, una con VIC y otra con FAM. Las sondas están diseñadas para unirse a la secuencia amplificada por los cebadores (iniciadores). Durante la PCR, la sonda que contenga la especificidad para el cambio alélico, es degradada por la Taq DNA polimerasa con actividad 5' exonucleasa, esto libera el fluorocromo lo que genera una señal fluorescente que se incrementa con cada ciclo (Tomado de Falcón-Ramírez, 2009).

Para la genotipificación de SNPs se utilizan dos sondas (TaqMan®), cada una posee una de las variantes alélicas a determinar. Dichas sondas emplean como donadores o reporteros los fluorocromos VIC® y FAM™ para diferenciarlos entre sí. Al iniciar la PCR, la sonda que hibrida con la secuencia diana es degradada por la DNA polimerasa, de tal manera que un incremento en la señal de fluorescencia de uno de los donadores se refiere a la homocigocidad para el nucleótido de interés. Por otra parte, si se observa fluorescencia tanto de VIC como de FAM, indica heterocigocidad.

El incremento en el DNA en cada ciclo se corresponde con un incremento de hibridación de las sondas, lo que conduce a un aumento proporcional de fluorescencia emitida; por lo que este sistema hace posible observar el incremento de la región de interés durante la reacción de PCR (Costa, 2004).

En el presente estudio cada una de las reacciones de PCR contenía 5 ng de DNA, 2.5 µL de TaqMan Master Mix, 0.0625 µL de 40x assay (sondas) y 2.437 µL de agua destilada libre de nucleasas (DNasa), para un volumen final de 5 µL. Para cada SNP se utilizaron sondas comerciales de Applied Biosystems (Tabla III).

Tabla III. Sondas TaqMan® para SNPs de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF*.

SNP	ID	Localización	Secuencia [VIC/FAM]
<i>JAG1</i>			
rs6514116	C__29449322_10	Chr.20:10638568	AGCCTGTTTCAGACAACAACACTGGGCT[A/G]ACCTAGTCCTGTCTGGATCTATTTT
rs2273061	C__16177763_10	Chr.20: 10639543	ACCCAGAGACAACCTGTTACCACTT[A/G]TTTACCTTCTTTAATGGGTACACAG
rs2235811	C__1265674_1_	Chr.20:10644158	GGAGCAGTGTGGGAAACCCGGAGAG[A/G]CTAGAAGCTCACCTGCCACCAAGT
rs6040061	C__1265679_20	Chr.20:10640306	AGACCTTGAACCTTGATGCATTCCAC[A/C]TTTCTCCTCTGCCAGAAGGCAGAT
<i>MEF2C</i>			
rs1366594	C__3297670_10	Chr.5:88376061	TTAAAAGATTGGAAAACAATTTGGC[A/C]TTATTTTGTGAGGCTTAACATTTAT
rs12521522	C__2836624_10	Chr.5:88112761	TTTTTTTCACTAGGTCTGAAAGAGA[A/T]TCCAGATACTTCTTGATTAACAAGT
rs11951031	C__2836609_10	Chr.5:88138731	CTTGAAATTAAGCGTGGGTTCTATT[C/T]TGGAACAGTGAAATGTCTGGACTGG
<i>BDNF</i>			
rs6265	C__11592758_10	Chr.11:27679916	TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[G/A]GTGTTTCGAAAGTGTCCAGCCAATGAT

Fuente: SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays (Applied Biosystems®, 2014).

Antes de llevar a cabo este procedimiento, se prepararon las muestras de DNA para lo cual se utilizó el material de la Tabla IV.

Tabla IV. Material y equipo requerido para la preparación de las muestras de DNA para PCR-TR.

Material	
Paños de baja pelusa (Kimwipes®)	Placa maestra de 96 pocillos (Applied Biosystem®)
Micropipeta (0 – 10 μ L)	Placas de 96 pocillos (Applied Biosystem®)
Micropipeta (10 – 100 μ L)	Puntillas para micropipeta (0 – 10 μ L)
Pipeta multicanal (0 – 10 μ L)	Puntillas para micropipeta (10 – 100 μ L)
Tubos eppendorf de 1.5 ml	Puntillas para pipeta multicanal
Agua libre de DNasa	Vórtex
Microcentrífuga	Cubierta adhesiva para placas TaqMan
PCR-Cooler (Eppendorf)	NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer

Procedimiento previo a la PCR-TR (Applied Biosystems, 2010):

Se realizaron las diluciones de cada muestra de DNA con agua destilada libre de DNasa a una concentración de 5 ng/ μ L para un volumen final de 60 μ L (para evitar pérdidas). Una vez listas las diluciones se procedió al llenado de la placa maestra (se colocaron las diluciones de las muestras de DNA en los pocillos de la placa –una muestra por pocillo-). A partir de ésta, se tomaron 5 μ L de cada pocillo con la pipeta multicanal y se depositaron en las placas para PCR de 96 pocillos, dejando cuatro espacios vacíos (2 para los blancos y 2 para los controles negativos: NTC). Se cubrieron cuidadosamente con un paño libre de pelusa (Kimwipes®) y se dejaron secar.

Una vez secas las placas se preparó el mix de reacción (este procedimiento se realizó en frío) para lo cual se calculó el volumen de cada componente (Tabla V).

Tabla V. Cálculo de las cantidades de reactivos del mix de reacción.

Reactivo	1 reacción (μL)	96 reacciones (μL)
TaqMan Master Mix	2.5	240*
40x assay (sondas)	0.0625	6*
Agua destilada libre de DNasa	2.437	234*
Volumen final	5	480*

*Cantidades necesarias para una placa para PCR de 96 pocillos.

Determinadas las cantidades, las sondas se descongelaron, se agitaron suavemente y se centrifugaron (los reactivos descongelados se mantuvieron en hielo). En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclaron los reactivos cuidando que las sondas no fueran expuestas a la luz. Una vez listo el mix de reacción, se distribuyó uniformemente en una tira de 8 tubos para PCR (Eppendorf®), se mezcló cuidadosamente en vórtex (para homogenizar) y se centrifugó. Con la pipeta multicanal se tomaron 5 μL del mix de reacción y se depositaron en los pocillos de las placas con DNA seco (las placas se colocaron sobre un cooler para PCR). Finalmente, las placas se cubrieron cuidadosamente con una cubierta adhesiva procurando sellar bien las orillas y que no les diera la luz, se centrifugaron y posteriormente se realizó PCR-TR en el sistema StepOne Plus PCR-RT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

El protocolo de amplificación se muestra en la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones de amplificación.

Etapa	No. de ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
1	1	30 s	60
2	1	10 min	95
3	45	15 s	95
		1 min	60
4	1	30 s	60

s= segundos, min= minutos

Los genotipos fueron identificados por medio de la detección de fluorescencia específica de alelo con el software StepOne™ v2.3 para la discriminación alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA).

7.2.6 Análisis estadístico

Una vez que se recopilaron los datos, se agruparon en una base de datos y se procedió con el análisis estadístico descriptivo correspondiente (media, desviación estándar y frecuencia). Las frecuencias genotípicas y alélicas de todas las variantes genéticas fueron reportadas en porcentajes y evaluadas por medio del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) utilizando el programa online de Michael H. Court (2005-2008) <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>.

Para determinar la asociación entre la DMO y los polimorfismos se utilizaron modelos de regresión lineal (modelos aditivo, dominante y recesivo), ajustando los valores por edad, índice de masa corporal (IMC) y niveles séricos de glucosa. Se consideraron estadísticamente significativos valores de probabilidad (p) menores de 0.05 ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó a través del paquete estadístico SPSS v.20 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

8. RESULTADOS

8.1 Características generales de la población

Se partió de dos bases de datos realizadas previamente, con un total de 229 expedientes, de los cuales 105 fueron descartados por tener datos incompletos, debido a que no se pudo obtener suficiente muestra de sangre, por pérdidas de las muestras de DNA durante el traslado, mujeres con parentesco familiar, así como mujeres cuyas muestras de DNA no se pudieron genotipificar. Se obtuvo un tamaño de muestra final de 124 mujeres de 40 a 80 años, las características generales de la población se muestran en medias y desviaciones estándar (DE) en la tabla VII.

Tabla VII. Características generales de la población estudiada.

Variable	Media (DE)
Edad (años)	63.45 (9.02)
Peso (Kg)	69.34 (13.13)
Estatura (cm)	154.39 (6.34)
IMC (Kg/m ²)	29.14 (4.95)
Grasa corporal (%)	44.69 (6.09)
<hr/>	
DMO (g/cm ²)	
<i>DMO-CT</i>	1.058 (0.099)
<i>DMO-C</i>	0.926 (0.127)
<i>DMO-CF</i>	0.862 (0.120)
<i>DMO-TW</i>	0.682 (0.137)
<i>DMO-T</i>	0.749 (0.115)
<i>DMO L1-L4</i>	0.999 (0.154)
<i>DMO L2-L4</i>	1.018 (0.165)
<hr/>	
Glucosa sérica (mg/dL)	110.53 (35.29)

N= 124

DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4. N= número de pacientes, DE= desviación estándar.

8.2 Determinación de los polimorfismos de los genes *JAG1*, *MEF2C* y

BDNF

La determinación de los polimorfismos estudiados se llevó a cabo por discriminación alélica en el equipo StepOne™ Software v2.3. En la figura 13 se muestran las gráficas de discriminación alélica resultantes de los SNPs rs6514116, rs2273061, rs2235811 y rs6040061 del gen *JAG1*. Mientras que en la figura 14 se aprecian las gráficas de los polimorfismos rs1366594 y rs6265 de los genes *MEF2C* y *BDNF*, respectivamente.

En el caso del gen *MEF2C* dos de los polimorfismos analizados (rs12521522 y rs11951031) fueron monomórficos para la población estudiada, es decir, que no existe variación alélica en dicha población. Por esta razón fueron excluidos del análisis posterior.

JAG1

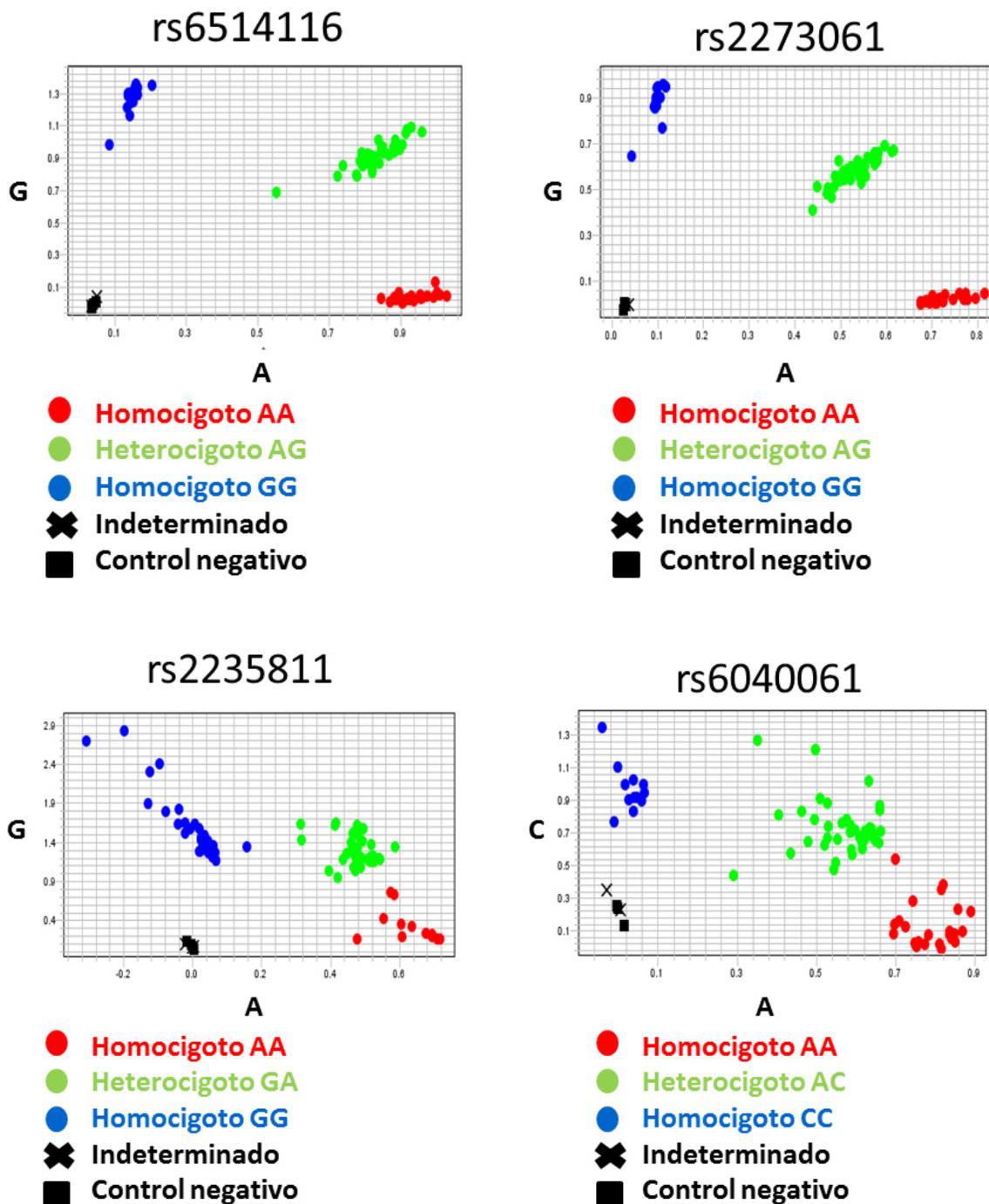


Figura 13. Gráficas de discriminación alélica de los polimorfismos de *JAG1*. Las gráficas de discriminación alélica fueron generadas por el equipo StepOne™ Software v2.3. Las coloraciones azules y rojas identifican los genotipos homocigotos para cada polimorfismo, mientras que los puntos verdes se refieren a los genotipos heterocigotos de los polimorfismos estudiados de *JAG1*. Los indeterminados corresponden a muestras de DNA que no fueron discriminadas. El cuadro en color negro (■) indica los controles negativos, para los cuales se utilizó agua destilada libre de DNasa.

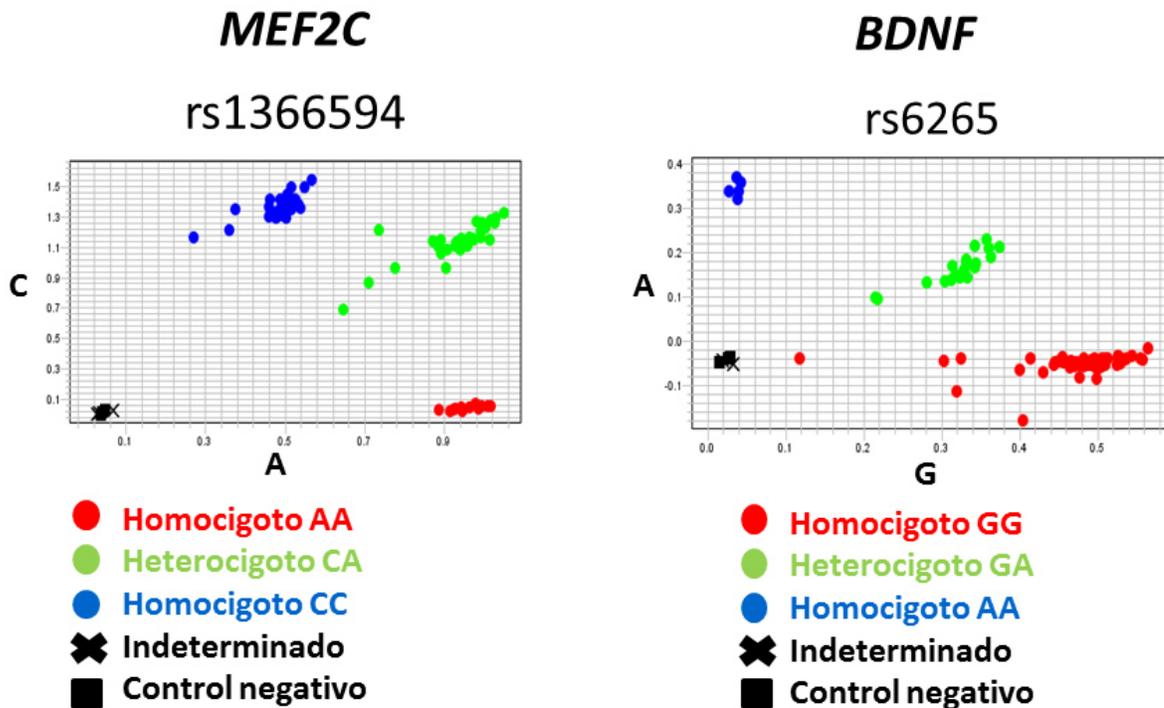


Figura 14. Gráficas de discriminación alélica de los polimorfismos de *MEF2C* y *BDNF*. Las gráficas de discriminación alélica fueron generadas por el equipo StepOne™ Software v2.3. En el polimorfismo rs1366594 del gen *MEF2C* los puntos azules corresponden al genotipo homocigoto para el alelo C, mientras que el homocigoto AA se localiza en la esquina inferior derecha en color rojo. Por otra parte, los puntos en color verde indican los heterocigotos (CA). Para el polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* en la esquina superior izquierda se localizan los homocigotos para el alelo A, al centro de la gráfica se ubican los heterocigotos y en la parte inferior derecha los homocigotos para el alelo G.

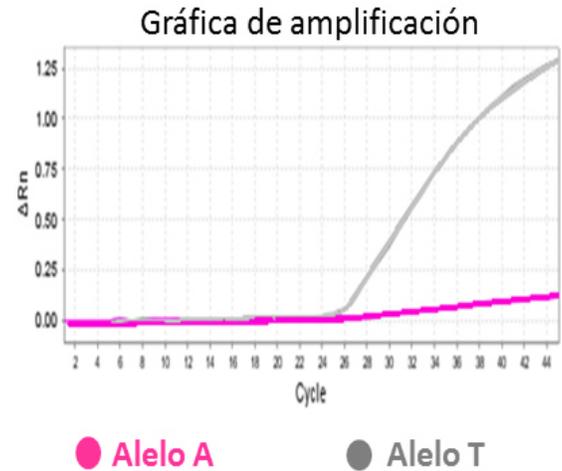
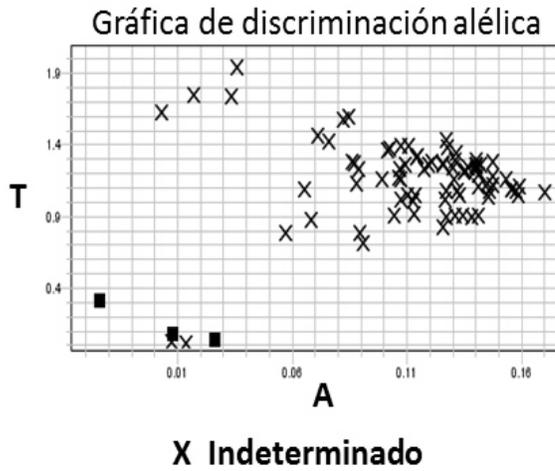
Ya que dos de los polimorfismos analizados de *MEF2C* resultaron monomórficos, se recurrió a las gráficas de amplificación (muestra por muestra) para verificar cuál de los alelos era el que estaba presente en los sujetos de estudio.

En la figura 15 se observa que para el SNP rs12521522, la población estudiada es homocigota para el alelo T (TT), por otra parte, para el SNP rs11951031 los sujetos de estudio son homocigotos para el alelo C (CC).

MEF2C

a)

rs12521522



b)

rs11951031

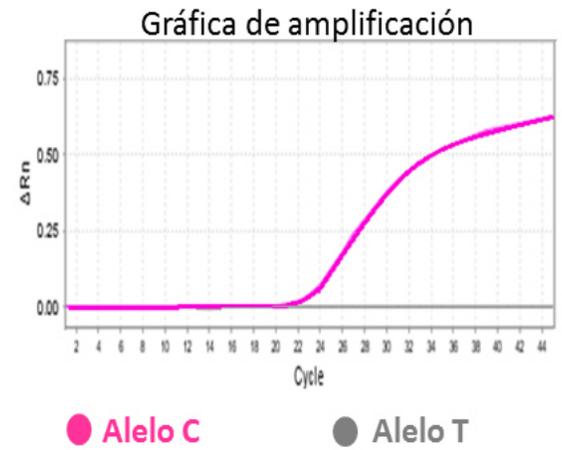
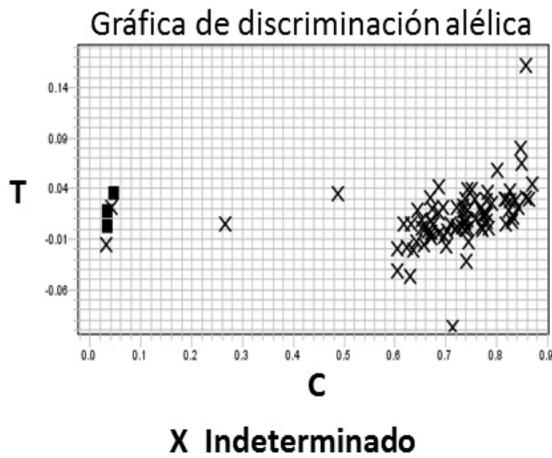


Figura 15. Gráficas de discriminación alélica y de amplificación de los polimorfismos monomórficos de *MEF2C*. a) SNP rs12521522, el cual amplificó para el alelo T. b) SNP rs11951031 amplificó para el alelo C.

8.3 Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF*

En la tabla VIII se muestran las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF*, así como las frecuencias alélicas de cada SNP. Además, se muestran los resultados del equilibrio de Hardy-Weinberg del total de las muestras.

Al realizar el análisis de frecuencias se observó que para los polimorfismos del gen *JAG1*, los genotipos de mayor frecuencia fueron los heterocigotos, siendo G el alelo de menor frecuencia (minor allele frequency, MAF) en dos de los polimorfismos (rs6514116, rs2273061), mientras que los SNPs rs2235811 y rs6040061, A y C fueron los MAF, respectivamente. En el caso del gen *MEF2C*, el genotipo heterocigoto (CA) del SNP rs1366494 fue el de mayor frecuencia. Por otro lado, el polimorfismo estudiado de *BDNF* (rs6265) presentó una mayor frecuencia el genotipo homocigoto GG. Para estos SNPs (rs1366494 y rs6265) los MAF fueron los alelos A (42.7% y 16.9%, respectivamente).

Los resultados del equilibrio de Hardy-Weinberg del total de las muestras, indican que los polimorfismos de los genes *JAG1* y *MEF2C* se encuentran en equilibrio, ya que mostraron valores de p por encima de 0.05, es decir, que los sujetos seleccionados en nuestro estudio pueden representar a la población en general. Sin embargo, el SNP rs6265 del gen *BDNF* no cumplió con este criterio ($p = 0.005$).

Tabla VIII. Frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos del gen *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* en mujeres mexicanas.

JAG1												
dbSNP	rs6514116			rs2273061			rs2235811			rs6040061		
Genotipo y Frecuencias	Genotipo	<i>N</i>	%									
	AA	42	33.9	AA	35	28.2	GG	49	40.2	AA	45	36.9
	AG	57	45.9	AG	62	50	GA	53	43.7	AC	58	47.5
	GG	25	20.2	GG	27	21.8	AA	20	16.1	CC	19	15.6
Frecuencia alélica	A	141	56.9	A	132	53.2	G	151	61.9	A	148	60.7
	G	107	43.1	G	116	46.8	A	93	38.1	C	96	39.3
HWE	<i>p</i> =0.483*			<i>p</i> =0.963*			<i>p</i> =0.382*			<i>p</i> =0.965*		

	MEF2C			BDNF		
dbSNP	rs1366594			rs6265		
Genotipo y Frecuencias	Genotipo	<i>N</i>	%	Genotipo	<i>N</i>	%
	CC	41	33.1	GG	90	72.6
	CA	60	48.4	GA	26	21
	AA	23	18.5	AA	8	6.4
Frecuencia alélica	C	142	57.3	G	206	83.1
	A	106	42.7	A	42	16.9
HWE	<i>p</i> =0.899*			<i>p</i> =0.005		

HWE= Equilibrio de Hardy-Weinberg, N= número de pacientes N=124
 *Cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$)

8.4 Determinación de la asociación de los polimorfismos de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* con densidad mineral ósea

El análisis de la asociación de los polimorfismos de los genes estudiados con la DMO fue llevada a cabo con un modelo de regresión lineal bajo los modelos de herencia aditivo, dominante y recesivo. En las tablas IX a la XII se muestran los valores de DMO (media y desviación estándar [DE]) encontrados en cada genotipo de los polimorfismos estudiados del gen *JAG1*, mientras que en las tablas XIII y XIV se observan los valores de DMO de los genotipos de los genes *MEF2C* y *BDNF*, respectivamente. Además, se presentan los valores de β para la asociación de los SNPs con DMO.

Al realizar el análisis de asociación en el polimorfismo rs6514116 (tabla IX) no se encontró diferencia significativa en ninguna de las regiones analizadas con los genotipos de este SNP, es decir que las medias de las DMO de las regiones estudiadas (cuerpo total, cadera total, triángulo de Wards, trocánter, cuello femoral, columna ap L1-L4 y L2-L4) son similares entre los diferentes genotipos. Sin embargo, se encontró en la DMO-CT cierta tendencia a una DMO mayor ($p= 0.062$) en el modelo dominante.

De la misma manera que el SNP rs6514116, en el polimorfismo rs2273061 (tabla X) solamente se observó en DMO-CT y DMO-T una tendencia hacia DMO alta con los modelos dominantes ($p= 0.052$ y $p= 0.087$, respectivamente).

En la tabla XI se muestran los valores de β para la asociación del SNP rs2235811 del gen *JAG1*, en el que se encontró asociación estadísticamente significativa con una DMO-CT alta en el modelo dominante ($p= 0.024$). En este mismo SNP se observó tendencia a DMO baja en la región de trocánter en el modelo dominante ($p= 0.061$), mientras que en la región de triángulo de Wards, dicho polimorfismo con el modelo dominante presentó tendencia a una DMO menor ($p= 0.093$).

Por otra parte, el polimorfismo rs6040061 (tabla XII) presentó en la DMO-CT y DMO-T tendencia a una DMO alta en los modelos dominantes ($p= 0.078$ y $p= 0.099$, respectivamente), mientras que en DMO-TW se observó tendencia a DMO baja en el modelo recesivo ($p= 0.063$).

Tabla IX. Asociación del polimorfismo rs6514116 del gen *JAG1* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	AA	AG	GG			
DMO-CT	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)			
	1.079 (0.104)	1.046 (0.093)	1.064 (0.106)	Aditivo	-0.009 (-0.027; 0.009)	0.330
				Recesivo	-0.007 (-0.039; 0.025)	0.682
				Dominante	0.026 (-0.001; 0.053)	0.062**
DMO-C	0.948 (0.127)	0.910 (0.115)	0.929 (0.151)	Aditivo	-0.008 (-0.032; 0.016)	0.536
				Recesivo	-0.011 (-0.054; 0.032)	0.611
				Dominante	0.026 (-0.011; 0.063)	0.164
DMO-TW	0.697 (0.114)	0.663 (0.138)	0.706 (0.172)	Aditivo	0.002 (-0.023; 0.028)	0.855
				Recesivo	-0.030 (-0.074; 0.015)	0.197
				Dominante	0.016 (-0.022; 0.055)	0.414
DMO-T	0.772 (0.122)	0.735 (0.100)	0.746 (0.132)	Aditivo	-0.010 (-0.033; 0.013)	0.381
				Recesivo	-0.005 (-0.046; 0.037)	0.825
				Dominante	0.028 (-0.007; 0.062)	0.123
DMO-CF	0.877 (0.102)	0.847 (0.118)	0.872 (0.153)	Aditivo	-0.004 (-0.027; 0.018)	0.715
				Recesivo	-0.015 (-0.056; 0.025)	0.457
				Dominante	0.021 (-0.013; 0.055)	0.230
DMO-L1-L4	1.015 (0.150)	0.990 (0.148)	1.003 (0.185)	Aditivo	-0.005 (-0.039; 0.029)	0.764
				Recesivo	-0.006 (-0.066; 0.055)	0.847
				Dominante	0.016 (-0.035; 0.068)	0.532
DMO-L2-L4	1.035 (0.165)	1.009 (0.155)	1.024 (0.198)	Aditivo	-0.005 (-0.042; 0.031)	0.769
				Recesivo	-0.006 (-0.071; 0.059)	0.852
				Dominante	0.017 (-0.038; 0.073)	0.542

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4.

**Tendencia hacia DMO alta.

Tabla X. Asociación del polimorfismo rs2273061 del gen *JAG1* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	AA	AG	GG			
DMO-CT	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)	Aditivo	-0.010 (-0.029; 0.008)	0.263
	1.081 (0.098)	1.054 (0.095)	1.050 (0.114)	Recesivo	-0.003 (-0.034; 0.028)	0.859
				Dominante	0.028 (0.000; 0.056)	0.052**
DMO-C	0.945 (0.124)	0.922 (0.118)	0.912 (0.153)	Aditivo	-0.007 (-0.032; 0.017)	0.558
				Recesivo	-0.005 (-0.047; 0.037)	0.820
				Dominante	0.022 (-0.016; 0.061)	0.258
DMO-TW	0.697 (0.113)	0.674 (0.133)	0.688 (0.179)	Aditivo	0.000 (-0.025; 0.026)	0.972
				Recesivo	-0.020 (-0.064; 0.024)	0.367
				Dominante	0.016 (-0.025; 0.057)	0.440
DMO-T	0.776 (0.123)	0.742 (0.102)	0.733 (0.128)	Aditivo	-0.012 (-0.036; 0.011)	0.308
				Recesivo	-0.002 (-0.043; 0.038)	0.918
				Dominante	0.032 (-0.005; 0.069)	0.087**
DMO-CF	0.872 (0.096)	0.860 (0.119)	0.856 (0.155)	Aditivo	-0.003 (-0.026; 0.021)	0.825
				Recesivo	-0.008 (-0.048; 0.031)	0.681
				Dominante	0.013 (-0.023; 0.050)	0.468
DMO-L1-L4	1.015 (0.137)	0.998 (0.153)	0.990 (0.188)	Aditivo	-0.006 (-0.040; 0.029)	0.748
				Recesivo	-0.005 (-0.064; 0.055)	0.877
				Dominante	0.018 (-0.036; 0.072)	0.518
DMO-L2-L4	1.036 (0.150)	1.016 (0.162)	1.013 (0.199)	Aditivo	-0.005 (-0.043; 0.032)	0.779
				Recesivo	-0.008 (-0.072; 0.056)	0.809
				Dominante	0.020 (-0.039; 0.078)	0.507

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4.
 **Tendencia hacia DMO alta.

Tabla XI. Asociación del polimorfismo rs2235811 del gen *JAG1* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	GG	GA	AA			
DMO-CT	media (DE)	media (DE)	media (DE)			
	1.079 (0.100)	1.040 (0.097)	1.071 (0.102)	Aditivo	0.011 (-0.008; 0.029)	0.254
				Recesivo	-0.013 (-0.048; 0.022)	0.467
				Dominante	0.030 (0.004;0.056)	0.024***
DMO-C	0.947 (0.119)	0.906 (0.128)	0.933 (0.140)	Aditivo	0.009 (-0.016; 0.033)	0.486
				Recesivo	-0.015 (-0.062; 0.032)	0.536
				Dominante	0.027 (-0.008; 0.063)	0.134
DMO-TW	0.694 (0.109)	0.660 (0.145)	0.722 (0.175)	Aditivo	-0.006 (-0.031; 0.020)	0.671
				Recesivo	-0.042 (-0.091; 0.007)	0.093*
				Dominante	0.012 (-0.025; 0.050)	0.519
DMO-T	0.774 (0.115)	0.731 (0.110)	0.741 (0.119)	Aditivo	0.015 (-0.008; 0.039)	0.204
				Recesivo	0.000 (-0.045; 0.045)	0.994
				Dominante	0.032 (-0.001; 0.066)	0.061**
DMO-CF	0.875 (0.097)	0.846 (0.129)	0.878 (0.150)	Aditivo	0.004 (-0.019; 0.026)	0.765
				Recesivo	-0.018 (-0.062; 0.026)	0.426
				Dominante	0.018 (-0.016; 0.051)	0.296
DMO-L1-L4	1.022 (0.146)	0.967 (0.154)	1.044 (0.173)	Aditivo	0.003 (-0.031; 0.038)	0.852
				Recesivo	-0.050 (-0.115; 0.016)	0.139
				Dominante	0.036 (-0.014; 0.086)	0.162
DMO-L2-L4	1.042 (0.161)	0.986 (0.160)	1.066 (0.186)	Aditivo	0.003 (-0.034; 0.040)	0.874
				Recesivo	-0.051 (-0.122; 0.020)	0.156
				Dominante	0.036 (-0.018; 0.090)	0.190

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4. *** Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). **Tendencia hacia DMO alta. *Tendencia hacia DMO baja.

Tabla XII. Asociación del polimorfismo rs6040061 del gen *JAG1* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	AA	AC	CC			
DMO-CT	media (DE)	media (DE)	media (DE)			
	1.075 (0.100)	1.045 (0.098)	1.074 (0.103)	Aditivo	-0.007 (-0.026; 0.012)	0.465
				Recesivo	-0.017 (-0.052; 0.019)	0.364
			Dominante	0.024 (-0.003; 0.051)	0.078**	
DMO-C	0.942 (0.118)	0.910 (0.130)	0.940 (0.140)	Aditivo	-0.007 (-0.032; 0.018)	0.561
				Recesivo	-0.015 (-0.062; 0.033)	0.546
				Dominante	0.024 (-0.012; 0.060)	0.192
DMO-TW	0.695 (0.108)	0.659 (0.143)	0.729 (0.173)	Aditivo	0.004 (-0.022; 0.031)	0.759
				Recesivo	-0.047 (-0.097; 0.003)	0.063*
				Dominante	0.019 (-0.029; 0.057)	0.340
DMO-T	0.771 (0.111)	0.735 (0.115)	0.747 (0.119)	Aditivo	-0.015 (-0.038; 0.009)	0.228
				Recesivo	0.003 (-0.042; 0.048)	0.897
				Dominante	0.029 (-0.005; 0.063)	0.099**
DMO-CF	0.870 (0.097)	0.848 (0.127)	0.888 (0.148)	Aditivo	0.001 (-0.023; 0.025)	0.930
				Recesivo	-0.026 (-0.071; 0.019)	0.257
				Dominante	0.013 (-0.021; 0.047)	0.464
DMO-L1-L4	1.020 (0.151)	0.977 (0.155)	1.029 (0.169)	Aditivo	-0.004 (-0.040; 0.032)	0.817
				Recesivo	-0.036 (-0.104; 0.032)	0.300
				Dominante	0.030 (-0.022; 0.081)	0.261
DMO-L2-L4	1.042 (0.166)	0.995 (0.161)	1.052 (0.180)	Aditivo	-0.004 (-0.043; 0.035)	0.837
				Recesivo	-0.039 (-0.112; 0.034)	0.290
				Dominante	0.031 (-0.024; 0.087)	0.270

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4.

**Tendencia hacia DMO alta. *Tendencia hacia DMO baja.

Al realizar el análisis de asociación de los valores de DMO de las diferentes regiones óseas con los genotipos del polimorfismo rs1366594 del gen *MEF2C* (tabla XIII), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna región analizada, bajo los modelos probados. Sin embargo, en DMO L1-L4 se observó tendencia a DMO baja con los modelos aditivo y recesivo ($p=0.057$ y $p=0.091$, respectivamente). Además, se observó esta misma tendencia en DMO L2-L4, es decir, bajo modelo aditivo y recesivo se encontró tendencia a DMO baja ($p=0.092$ y $p=0.091$, respectivamente).

De la misma manera que los polimorfismo de *JAG1* y *MEF2C*, no se encontraron diferencias significativas en el polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* (tabla XIV), pero en DMO L1-L4 se encontró tendencia a DMO alta con el modelo recesivo ($p=0.092$).

Tabla XIII. Asociación del polimorfismo rs1366594 del gen *MEF2C* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	CC	CA	AA			
DMO-CT	media (DE)	media (DE)	media (DE)			
	1.071 (0.117)	1.052 (0.093)	1.060 (0.085)	Aditivo	-0.011 (-0.029; 0.008)	0.257
				Recesivo	-0.019 (-0.052; 0.014)	0.257
DMO-C				Dominante	-0.011 (-0.039; 0.017)	0.454
	0.961 (0.138)	0.909 (0.113)	0.913 (0.136)	Aditivo	0.005 (-0.020; 0.030)	0.689
				Recesivo	-0.001 (-0.046; 0.044)	0.971
DMO-TW				Dominante	0.012 (-0.026; 0.050)	0.526
	0.711 (0.138)	0.662 (0.135)	0.688 (0.144)	Aditivo	-0.005 (-0.031; 0.021)	0.709
				Recesivo	-0.018 (-0.065; 0.029)	0.446
DMO-T				Dominante	0.002 (-0.038; 0.041)	0.937
	0.779 (0.114)	0.736 (0.098)	0.733 (0.145)	Aditivo	0.005 (-0.019; 0.029)	0.707
				Recesivo	0.003 (-0.040; 0.046)	0.875
DMO-CF				Dominante	0.008 (-0.028; 0.044)	0.664
	0.884 (0.125)	0.848 (0.112)	0.863 (0.135)	Aditivo	-0.007 (-0.030; 0.017)	0.571
				Recesivo	-0.014 (-0.056; 0.028)	0.523
DMO-L1-L4				Dominante	-0.006 (-0.041; 0.030)	0.752
	1.000 (0.169)	0.991 (0.143)	1.027 (0.167)	Aditivo	-0.034 (-0.069; 0.001)	0.057*
				Recesivo	-0.054 (-0.116; 0.009)	0.091*
DMO-L2-L4				Dominante	-0.038 (-0.091; 0.014)	0.152
	1.026 (0.179)	1.006 (0.153)	1.049 (0.180)	Aditivo	-0.032 (-0.070; 0.005)	0.092*
				Recesivo	-0.058 (-0.125; 0.009)	0.091*
			Dominante	-0.032 (-0.089; 0.025)	0.267	

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4.
* Tendencia hacia DMO baja.

Tabla XIV. Asociación del polimorfismo rs6265 del gen *DBNF* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas.

Región	Genotipos			MODELO	β (95% IC)	P
	GG	GA	AA			
DMO-CT	media (DE)	media (DE)	media (DE)	Aditivo	0.000 (-0.022; 0.021)	0.981
	1.058 (0.102)	1.086 (0.098)	1.012 (0.057)	Recesivo	0.032 (-0.020; 0.084)	0.229
				Dominante	-0.009 (-0.038; 0.020)	0.530
DMO-C	0.919 (0.130)	0.964 (0.122)	0.891 (0.088)	Aditivo	0.013 (-0.016; 0.042)	0.394
				Recesivo	0.018 (-0.052; 0.089)	0.615
				Dominante	-0.028 (-0.067; 0.011)	0.155
DMO-TW	0.678 (0.137)	0.717 (0.148)	0.637 (0.117)	Aditivo	0.002 (-0.029; 0.032)	0.918
				Recesivo	0.034 (-0.040; 0.108)	0.368
				Dominante	-0.013 (-0.054; 0.028)	0.527
DMO-T	0.745 (0.120)	0.781 (0.101)	0.704 (0.069)	Aditivo	0.007 (-0.021; 0.035)	0.644
				Recesivo	0.030(-0.037; 0.098)	0.380
				Dominante	-0.021 (-0.058; 0.016)	0.270
DMO-CF	0.862 (0.118)	0.879 (0.135)	0.820 (0.112)	Aditivo	-0,005 (-0.032; 0.022)	0.728
				Recesivo	0.030 (-0.036; 0.095)	0.380
				Dominante	0.000 (-0.037; 0.036)	0.986
DMO-L1-L4	1.001 (0.159)	1.032 (0.150)	0.902 (0.111)	Aditivo	-0.016 (-0.056; 0.025)	0.455
				Recesivo	0.084 (-0.014; 0.182)	0.092**
				Dominante	0.002 (-0.052; 0.057)	0.938
DMO-L2-L4	1.020 (0.170)	1.056 (0.160)	0.927 (0.114)	Aditivo	-0.011 (-0.055; 0.033)	0.623
				Recesivo	0.078 (-0.028; 0.184)	0.149
				Dominante	-0.004 (-0.063; 0.055)	0.894

DE= desviación estándar, IC = intervalo de confianza, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-TW= densidad mineral ósea en triángulo de Wards, DMO-T= densidad mineral ósea en trocánter, DMO-CF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO-L1-L4= densidad mineral ósea en lumbar 1 – lumbar 4, DMO-L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 – lumbar 4.
 **Tendencia hacia DMO alta.

9. DISCUSIÓN

La osteoporosis es la enfermedad más común de todos los trastornos metabólicos del hueso (Guglielmi et al., 2011), se caracteriza por una DMO baja y se presenta sobre todo como consecuencia del envejecimiento normal y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, lo que conlleva a un incremento en la susceptibilidad de fracturas (OMS, 2003). Gracias a los continuos avances en salud, se espera que la expectativa de vida vaya en aumento, lo que probablemente garantice un crecimiento de la población anciana y por consecuencia, el número de fracturas aumente (IOF, 2012). Por otra parte, esta enfermedad es un grave problema de salud pública en México, ya que se estima que el 17% de las mujeres mayores de 50 años presenta osteoporosis. Además, los costos que representan para los sistemas de salud pública los recursos y cuidados necesarios de los pacientes con fracturas osteoporóticas, son bastante elevados (Clark et al., 2010).

La osteoporosis, de acuerdo con diversos estudios, es de origen multifactorial y el factor genético desempeña un papel importante en su aparición y/o en la susceptibilidad a fracturas pues tiene un alto grado de heredabilidad (estimada entre el 60 y 85%) (Ng et al., 2006). Estudios recientes han señalado el papel de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* involucrados en variaciones de la DMO. La mayoría de estos estudios se han realizado en poblaciones de ancestría europea y asiática. Por otro lado, se han observado inconsistencias en los resultados entre *MEF2C* y DMO en las diferentes poblaciones estudiadas (Zheng et al., 2013), así como lo reportado previamente en el estudio del gen *JAG1* en población de origen étnico mexicano-mestizo del Distrito Federal (Rojano-Mejía et al., 2013), aunado a la ausencia de estudios de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* en sujetos del norte de México. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la asociación entre cuatro polimorfismos de gen *JAG1*, tres polimorfismos del gen *MEF2C* y un polimorfismo del gen *BDNF* con la variación de la DMO en mujeres del norte de México.

Se utilizó la densitometría dual de rayos X para realizar la medición de la DMO en diferentes regiones óseas. Los valores de DMO en cuello femoral encontrados en la población de estudio fueron similares a los reportados por Velázquez-Cruz (2014) en mujeres mexicanas del centro del país; sin embargo, los valores de DMO L2-L4 fueron ligeramente mayores en nuestra población en comparación con la del centro del país, posiblemente por las diferencias en el estilo de vida de los sujetos, así como por los diferentes grados de susceptibilidad genética de la población estudiada. Se ha descrito que las mujeres del norte de México presentan valores de DMO superiores a las mujeres del centro y sur del país (Delezé et al., 2000). Sin embargo, ambos grupos de estudio se ubican en la categoría de osteopenia ya que poseen valores de DMO L2-L4 en el rango de T-Score de -1 a -1.5 DE (0.980 a 1.047 g/cm²) (Riggs & Melton, 1992; Tamayo et al., 2009).

En la tabla XV se muestran valores promedio de DMO-CT, DMO-C y DMO-CF y DMO L2-L4 determinados en diferentes poblaciones, observándose que son similares o inferiores a los reportados en nuestra población de estudio. Tal es el caso del estudio realizado por Horst-Sikorska (2013) en mujeres de Polonia, cuyos valores de DMO-C y DMO L2-L4 se ubican en la categoría de osteoporosis (Hough et al., 2010). Por otra parte, los valores promedio de DMO-CF y DMO L2-L4 obtenidos en nuestro estudio son mayores a los reportados en poblaciones de Estados Unidos y Brasil, no obstante, en esos estudios solamente se reclutaron mujeres postmenopáusicas osteoporóticas (Rapuri et al., 2001; Valente Da Silva et al., 2007), por lo tanto, es de esperarse que la DMO se encuentre disminuida. Los valores de DMO-CF y DMO L2-L4 reportados en esta investigación, son similares a los reportados por Delezé (2000) en población del centro y sur de México, considerando que en la investigación realizada por este autor, los sujetos de estudio son mujeres de 20 a 90 años de edad, por lo que las mujeres jóvenes podrían contribuir en gran medida a la presencia de valores superiores de DMO. No obstante, los valores

promedio de DMO en mujeres de 40 a 80 años de edad del sur de México (Delezé et al., 2000) (considerando que la edad es igual a la utilizada en nuestra investigación), son inferiores a los reportados en nuestra población. Por otra parte, se debe enfatizar que las poblaciones poseen características diferentes, primordialmente la edad y el origen étnico por lo que se deben manejar con cautela al hacer estas comparaciones entre las poblaciones.

Tabla XV. Densidad mineral ósea (g/cm^2) en diferentes poblaciones (media \pm DE).

Referencia	Grupo de estudio	Población	DMO-CT	DMO- C	DMO-CF	DMO L2-L4
Nuestro estudio	Mujeres de 40 a 80 años	Mexicana (Nuevo León)	1.058 \pm 0.099	0.926 \pm 0.127	0.862 \pm 0.120	1.018 \pm 0.165
Delezé et al., 2000	Mujeres de 20 a 90 años	Norte de México	---	---	0.895 \pm 0.140	1.089 \pm 0.180
		Centro de México	---	---	0.864 \pm 0.140	1.064 \pm 0.170
	Mujeres de 40 a 80 años	Sur de México	---	---	0.844 \pm 0.140	1.013 \pm 0.190
		Sur de México	---	---	0.822 \pm 0.125	0.992 \pm 0.167
Rapuri et al., 2001	Mujeres de 65 a 77 años	Americana	1.003 \pm 0.008	---	0.763 \pm 0.007	0.994 \pm 0.014
Valente Da Silva et al., 2007	Mujeres de 41 a 60 años	Brasileña	---	---	0.798 \pm 0.113	0.992 \pm 0.178
Horst-Sikorska et al., 2013	Mujeres caucásicas de 47 a 88 años	Polonia	---	0.695 \pm 0.088	---	0.842 \pm 0.148
Velázquez-Cruz et al., 2014	Mujeres >45 años	Mexicanas (Cuernavaca, Morelos)	---	0.927 \pm 0.133	0.878 \pm 0.125	0.997 \pm 0.151

DE= desviación estándar, DMO-CT= densidad mineral ósea en cuerpo total, DMO-C= densidad mineral ósea en cadera total, DMO-DF= densidad mineral ósea en cuello femoral, DMO L2-L4= densidad mineral ósea en lumbar 2 - lumbar 4.

Estudios recientes de asociación del genoma completo e investigaciones en genes candidatos en adultos han identificado 70 loci genéticos asociados con variaciones en la DMO en poblaciones de ascendencia europea y asiática, sin embargo se han encontrado resultados contradictorios, además de que algunos loci no han sido replicados en otras poblaciones (Wu et al., 2013). En Nuevo León, los estudios de asociación de genes candidatos con la variación de la DMO son limitados, además se debe considerar que la población mexicana posee una mezcla de ancestría europea, nativa americana y una pequeña proporción de ancestría africana (Silva-Zolezzi et al., 2009).

Al realizar el análisis de asociación de los polimorfismos de *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* con variaciones en la DMO en diferentes regiones óseas, en el presente estudio se encontró asociación estadísticamente significativa con el polimorfismo rs2235811 del gen *JAG1* bajo modelo recesivo en DMO en cuerpo total. Sin embargo, los estudios anteriores no reportan valores de DMO en dicha área ya que las regiones más susceptibles de variaciones en la DMO fueron cuello femoral y columna ap (Hough et al., 2010).

Para el resto de los polimorfismos estudiados no se encontró asociación estadísticamente significativa bajo ningún modelo, no obstante se observaron tendencias tanto a baja como a alta DMO en sitios específicos.

En un estudio de asociación del genoma completo realizado por Kung et al. (2010) se analizó el SNP rs2273061 de *JAG1* encontrando asociación con la variación de la DMO en espina lumbar y en cuello femoral en sujetos con ancestría europea y población asiática (Hong Kong). Dicha asociación persistió incluso después de ajustar los datos por edad y peso. Además, Kung et al. (2010) identificaron que el MAF de rs2273061 (G) se asocia con la presencia de mayor DMO. En nuestro estudio no se observó asociación con DMO bajo ningún modelo, estos datos están en concordancia con lo reportado por Rojano-Mejía, et al. (2013) en mujeres posmenopáusicas de origen étnico México-mestizo en el Distrito Federal. Sin embargo, en nuestra población de estudio se encontró tendencia a mayor DMO en cuerpo total y en trocánter ($p= 0.052$ y $p=$

0.087, respectivamente) en el modelo dominante. Es probable que estas variaciones se deban a la estratificación de la población, es decir, que existen diferencias genéticas entre la población en diferentes regiones de México. Se ha identificado que los individuos del centro del país poseen una mayor proporción de ancestría africana en comparación con el sur y el norte de México; mientras que la región norte se encuentra más cerca de la ancestría europea y amerindia. Por su parte el sur de México es la región con menor contribución continental, es decir, en el sur se localizan sujetos con ancestría amerindia (Silva-Zolezzi et al., 2009).

Adicionalmente, las investigaciones documentan que el genotipo AA del polimorfismo rs2273061 se asocia con una menor presencia de DMO en espina lumbar y cuello femoral, mientras que el genotipo GG con mayores valores de DMO (Kung et al, 2010). En nuestra población de estudio el alelo de menor frecuencia (MAF) del polimorfismo rs2273061 (0.47) fue mayor que el reportado para la población de Hong Kong (0.31) (Kung et al., 2010). A pesar de no encontrar asociación entre DMO y este polimorfismo en nuestro estudio, se observó tendencia a mayor DMO en cuerpo total y trocánter bajo el modelo dominante. Además, la frecuencia del MAF del polimorfismo rs2273061 en nuestra población, es similar al reportado en mujeres del Distrito Federal, México (Rojano Mejía et al., 2013). Por otra parte, en nuestra investigación los SNP rs6514116 y rs6040061 de *JAG1* presentan frecuencias (Tabla XVI) similares a los reportados en población con ancestría europea, china y africana. No obstante, el MAF del polimorfismo rs2235811 es similar a lo descrito en población con ancestría europea y difiere a lo reportado en poblaciones de ancestría china y africana. El MAF del polimorfismo rs1366594 del gen *MEF2C* presenta similitud a la población europea y china, mientras que es diferente de la población con ancestría africana. Por otro lado, el alelo de menor frecuencia del SNP rs6265 (gen *BDNF*) en nuestra población de estudio es similar a lo descrito en población europea pero difiere de poblaciones con ancestría china y africana en una base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, 2014).

Tabla XVI. Alelo de menor frecuencia de polimorfismos de *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* en diferentes poblaciones.

SNP	Localización	MAF	Población estudiada (%)	CEU (%)	ASW (%)	CHBC (%)	YRI (%)	DF (%)
<i>JAG1</i>								
rs6514116	Intron 4	G	43.1	59	---	47	52	---
rs2273061	Intron 3	G	46.8	63	---	50	57	41
rs2235811	Intron 3	A	38.1	55	34	65*	63*	---
rs6040061	Intron 3	C	39.3	54	---	35	42	---
<i>MEF2C</i>								
rs1366594	Hacia el extremo 5'	A	42.7	52	---	38	8*	---
<i>BDNF</i>								
rs6265	Exón 2	A	16.9	20	5*	63*	0*	---

MAF= Alelo de menor frecuencia.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, 2014; Rojano-Mejía, 2013)

CEU= Residentes de Utah con ancestría del norte y occidente de Europa.

ASW= Residentes del sudoeste de E.U.A. con ancestría africana.

CHBC= Chinos Han en Beijing, China.

YRI= Yoruba en Ibadán, Nigeria.

DF= Mujeres del Distrito Federal, México.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Estudios recientes reportan que el polimorfismo rs1366594 del gen *MEF2C* está asociado con DMO en cuello femoral y espina lumbar, sin embargo para la población estudiada en la presente investigación no se encontró asociación con ninguna región ósea analizada. De acuerdo con Rivadeneira et al. (2009) y con Zheng et al. (2013), se encontró que este SNP, ubicado 197 Kb arriba de la caja de transcripción MADS-2, tiene asociación con DMO en cuello femoral en población del norte de Europa, resultados contrarios a los reportados en población Asiática, en los que dicho SNP no se asoció con DMO en cuello femoral, sino con DMO en cadera (Styrkarsdottir et al., 2010).

En nuestra población de estudio el alelo de menor frecuencia del polimorfismo rs1366594 (0.43) presentó similitudes con los reportados para población Europea (0.45) y fue inferior a la población Asiática (0.58) (Styrkarsdottir et al., 2010), así como se encuentra muy por debajo a lo reportado en población de Nigeria (0.92) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, 2014).

Otro de los polimorfismos de *MEF2C* que han sido recientemente estudiados es el SNP rs11951031, el cual se ha encontrado asociado con DMO en antebrazo (Zheng et al., 2013). Sin embargo, en la población analizada en nuestro estudio resultó monomórfico. Esto puede explicarse, en parte, por nuestro tamaño de muestra para detectar un alelo de riesgo que tuvo una frecuencia de 0.06 en población Méxicoamericana con un tamaño de muestra de 715 individuos (Zheng et al., 2013).

Investigaciones recientes han mostrado evidencias de asociación del polimorfismo rs6265 (gen *BDNF*) con variaciones en la DMO, dada su implicación en la diferenciación y proliferación de células no neurales como células endoteliales y osteoblastos (Kajiya et al., 2008). El SNP rs6265 del gen *BDNF* se localiza en la región N-terminal, se caracteriza por el cambio alélico G/A (alelo de mayor frecuencia/ alelo de menor frecuencia) que codifica dos isoformas de la proteína BDNF con residuos de aminoácido Valina (V) y Metionina (M) en la posición 66 (abreviado como BDNF-V66 y BDNF-M66), respectivamente. La isoforma BDNF-V66 crea un nuevo sitio de fosforilación

que puede ser dirigido y catalizado por la proteína quinasa CHEK2 (serina/treonina: regula los sitios de control del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño en el DNA) en comparación con la isoforma BDNF-M66. Es decir que la isoforma BDNF-V66 incrementa la expresión de genes marcadores osteoblásticos como osteopontina, fosfatasa alcalina y BMP2 (proteína morfogénica ósea 2) además de promover la diferenciación osteoblástica (Deng et al., 2013).

De acuerdo con la investigación realizada por Estrada (2012) en varones con ancestría Europea y de Asia Oriental, se asoció al SNP rs6265 con DMO en cuello femoral. Los sujetos homocigotos con el alelo de menor frecuencia (AA) presentaron significativamente menor DMO en comparación con los individuos con el alelo G (GA y GG).

De la misma manera, Deng et al. (2013) estudió el SNP rs6265 del gen *BDNF* en 5000 individuos no relacionados caucásicos (estadounidenses de origen europeo) y de la región sur de China. Estos autores reportaron resultados similares a los de Estrada (2012), encontrando asociación entre el gen *BDNF* con DMO en cadera total y en espina lumbar en sujetos caucásicos, mientras que en sujetos de origen chino sólo se asoció con DMO en cadera total. Además, los sujetos homocigotos AA presentaron niveles menores de DMO en cadera total en comparación con los individuos con el alelo G (GA y GG). A pesar de estos resultados, en la población analizada en nuestro estudio no se encontró asociación entre rs6265 con DMO. La pérdida del equilibrio de Hardy-Weinberg puede ser ocasionada por una baja frecuencia del MAF, así como por el método de genotipificación, ya que en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados pues resulta más fácil detectar un genotipo que otros (Iniesta, Guinó & Moreno, 2005); es posible que por estas razones no se observó asociación entre rs6265 con DMO en nuestra población, ya que el alelo de menor frecuencia en los sujetos de estudio se encontró muy bajo (0.17), por lo que estos datos deben ser tratados con reserva. Por otra parte, en este polimorfismo, el alelo que presentó mayor frecuencia fue el alelo G (83.1),

dicho alelo se ha asociado con valores de DMO mayores en cuello femoral en comparación del alelo A, este hallazgo sugiere que la población de nuestro estudio posee un alelo protector contra baja DMO.

En resumen, a pesar de sólo encontrar asociación con un polimorfismo (rs2235811) en DMO de cuerpo total de todos los polimorfismos y las regiones óseas analizadas, los estudios previos demuestran la relación de dichos SNPs con variaciones en la DMO. Esto puede exhortar a que los resultados obtenidos en esta investigación pueden deberse al tamaño pequeño de la muestra o a las diferencias en las frecuencias en las distintas poblaciones (etnicidad) para el polimorfismo analizado. Por esta razón, los resultados deben ser manejados con cautela. Se recomienda aumentar el tamaño de muestra para incrementar el poder estadístico del estudio, así como realizar estudios en otras poblaciones de México.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que tanto los polimorfismos de *JAG1* como los de *MEF2C* y *BDNF* podrían desempeñar un papel en la variación de la DMO en mujeres del norte del país.

10. CONCLUSIONES

Dados los resultados anteriores, se establecen las siguientes conclusiones:

- Los valores de la densidad mineral ósea determinados, podrán ser utilizados como valores de referencia para evaluar si es necesaria la toma de medidas preventivas para incrementar la DMO, ya que las mujeres de 40 a 80 años que participaron en el estudio, poseen una DMO ubicada en los rangos de osteopenia y osteoporosis.
- Este es el primer reporte sobre las frecuencias de los genotipos de los polimorfismos de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* en mujeres del norte de México.
- A diferencia de lo reportado en otras poblaciones, la población estudiada es monomórfica para los polimorfismos rs12521522 y rs11951031 del gen *MEF2C*.
- La población de estudio posee una mayor frecuencia del alelo G (83.1%) en el polimorfismo rs6265 (G/A), este alelo se ha asociado con valores más altos de DMO en cuello femoral en comparación con el alelo A, este hallazgo sugiere que la población de nuestro estudio posee un alelo protector contra baja DMO.
- Este es el primer reporte de la asociación de los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* con la DMO en mujeres del norte de México.
- En el presente estudio se encontró asociación con DMO de cuerpo total con el polimorfismo rs2235811, únicamente bajo el modelo recesivo.
- La presente investigación podría servir como referencia para estudios futuros que relacionen los genes *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF* con la variación de la densidad mineral ósea y/o con la etiopatología de la osteoporosis.

11. LITERATURA CITADA

1. Acton, Q. A. (2013). *Issues in joint, bone, and connective tissue diseases and disorders*. Atlanta, Georgia (pp. 190): Scholarly Editions.
2. Applied Biosystems®. (2010). *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*. Life Technologies. Recuperado el 5 de febrero de 2014: http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/Documents/PDFs/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays.pdf
3. Applied Biosystems®. (2014). *SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays*. Recuperado el 5 de febrero de 2014 de: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>
4. Ayus, J. C., Tejedor, A., & Caramelo, C. (2007). *Agua, electrolitos y equilibrio ácido-base: aprendizaje mediante casos clínicos*. Madrid, España: Médica Panamericana.
5. Bai, S., Kopan, R., Zou, W., Hilton, M. J., Ong, C., Long, F., Teitelbaum, S. L. (2008). NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6509–6518. doi: 10.1074/jbc.M707000200.
6. Balch, P. A. (2000). *Recetas nutritivas que curan: guía práctica de la A hasta la Z para disfrutar de una buena salud con vitaminas, minerales, hierbas y suplementos alimentarios*. E.U.A: Penguin Group.
7. Barbuto, R., & Mitchell, J. (2013). Regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by osterix and its inhibition by parathyroid hormone. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(1), 99-108. doi: 10.1530/JME-12-0251.
8. Camerino, C., Zayzafoon, M., Rymaszewski, M., Heiny, J., Rios, M., & Hauschka, V. (2012). Central depletion of brain-derived neurotrophic factor in mice results in high bone mass and metabolic phenotype. *Endocrinology*, 153, 5394-5405. doi: 10.1210/en.2012-1378

9. Canalis, E., Giustina, A., & Bilezikian, J.P. (2007). Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 357, 905-916. doi: 10.1056/NEJMra067395
10. Canby, C. A. (2007). *Anatomía basada en la resolución de problemas*. Barcelona, España: Elsevier.
11. Castelo-Branco, C., & Haya-Palazuelos, J. (2008). *Osteoporosis y menopausia*. Madrid, España: Médica Panamericana.
12. Cediél, J. F., Cárdenas, M. H., García, A., Chuaire, L., Payán, C., Villegas, V., & Sánchez, C. (2009). *Manual de histología. Tejidos fundamentales*. Bogotá, Colombia: Universidad del Rosario.
13. Checa-Caratachea, M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. México, 20(3), 213-221.
14. Chen, S., Lee, B. H., & Bae, Y. (2013). Notch signaling in skeletal stem cells. *Calcified Tissue International*, 94(1), 68-77. doi: 10.1007/s00223-013-9773-z.
15. Christodoulou, C., & Cooper, C. (2003). What is osteoporosis?. *Postgraduate Medical Journal*. 79: 133-138. doi:10.1136/pmj.79.929.133
16. Clark, P., Carlos, F., & Vázquez-Martínez, L. J. (2010). Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Archives of Osteoporosis*, 5, 9-17.
17. Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305.
18. Court, M. H. (2005-2008). *Tufts University Comparative and Molecular Pharmacogenomics Laboratory. A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium*. <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>

19. Davis, L. A., & Nieden, N. I. (2008). Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*, 2658–2674. doi: 10.1007/s00018-008-8042-1
20. Delezé, M., Cons-Molina, F., Villa, A. R., Morales-Torres, J., González-González, J. G., Calva, J. J., ...Elizondo, J. (2000). Geographic differences in bone mineral density of mexican women. *Osteoporosis International*, *11*, 562-569.
21. Deng, F. Y., Tan, L. J., Shen, H., Liu, Y. J., Liu, Y. Z., Li, J., ...Deng, H. W. (2013). SNP rs6265 regulates protein phosphorylation and osteoblast differentiation and influences BMD in humans. *Journal of Bone Mineral Research*, *28*, 2498-2507. doi: 10.1002/jbmr.1997.
22. Deng, H. W., Shen, H., Xu, F. H., Deng, H. Y., Conway, T., Zhang, H. T., & Recker, R. R. (2002). Test of linkage and/or association of genes for vitamin D receptor, osteocalcin, and parathyroid hormone with bone mineral density. *Journal of Bone Mineral Research*, *17*(4), 678-686.
23. Dennison, E., Mohamed, M. A., & Cooper, C. (2006). Epidemiology of osteoporosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, *32*(4), 617-629.
24. Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica* (4ª ed.). Barcelona, España: Reverté.
25. Escalante-García, N. E. (2013). *Asociación de los polimorfismos BsmI, TaqI y ApaI del gen VDR con la densidad mineral ósea y riesgo a fracturas*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey.
26. Escobar-Gómez, F., Jódar, E., & Hawkins, F. (2009). Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, *18*(2), 39-44. doi: 10.1016/S1132-8460(09)72053-7
27. Estrada, K., Styrkarsdottir, U., Evangelos, E., Hsu, Y. H., Duncan, E. L. Ntzani, E. E., ...Rivadeneira, F. (2012). Genome-wide meta-analysis

identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature Genetics*, 44(5), 491-501. doi: 10.1038/ng.2249.

28. Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares* (4ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
29. Falcón-Ramírez, E. (2009). *Polimorfismos en el gen LRP5 y su relación con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas*. Tesis de doctorado no publicada. Instituto Politécnico Nacional. México, Distrito Federal.
30. Fernández-Tresguerres, I., Alobera-García, M. A., Canto-Pingarrón, M., & Blanco-Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11, E151-E157.
31. Fitzgerald, R., Kaufer, H., & Malkani, A. L. (2004). *Ortopedia. Volumen 2* (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
32. Fuentes-Arderiu, X., Castiñeiras-Lacambra, M. J. & Queraltó-Compañó, J. M. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular* (2ª ed.). Barcelona, España: Reverté.
33. Gal-Iglesias, B., López-Gallardo, M., Martín-Velasco, A. I., & Prieto-Montalvo, J. (2007). *Bases de la fisiología*. (2ª ed.). España: Tébar.
34. Garzón-Alvarado, D. A., Roa-Garzón, M. A., & Cortés-Rodríguez, C.J. (2004). *Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración ósea*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
35. Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodnie, P. V. N., Komm, B. S., ...Lian, J. B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *Runx2* gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 33132-33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200.
36. Genetics Home Reference. (2010). *Gene. JAG1*. Recuperado el 3 de Febrero de 2014, de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAG1>
37. Genetics Home Reference. (2013). *Genes. BDNF*. Recuperado el 17 de Marzo del 2014 de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BDNF>

38. Genetics Home Reference. (2014). *Genes. Mef2c*. Recuperado el 17 de marzo de 2014 de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEF2C>
39. Gifre, L., Ruiz-Gaspá, S., Monegal, A., Nomdedeu, B., Guañabens, N., & Peris, P. (2013). Esclerostina y Dkk-1 séricos en pacientes que inician tratamiento con glucocorticoides. Resultados preliminares. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(4), 127-132. doi: 0.4321/S1889-836X2013000400002.
40. Gómez de la Garza, M. (2013). *Desarrollo y validación de una ecuación antropométrica para estimar la masa apendicular muscular utilizando como referencia la absorciometría dual de rayos X en adultos mayores*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey.
41. Guglielmi, G., Muscarella, S., & Bazzocchi, A. (2011). Integrated imaging approach to osteoporosis: State of the Art. Review and Update. *Radio Graphics*, 31 (5), 1343–1364. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/rg.315105712>
42. Harvey, N., Dennison, E., & Cooper, C. (2010). Osteoporosis; impact on health and economics. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(2), 99-105.
43. Horst-Sikorska, W., Dytfeld, J., Wawrzyniak, A., Marcinkowska, M., Michalak, M., Franek, E., ...Słomski, R. (2013). Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Molecular Biology Reports*, 40, 383–390. doi: 10.1007/s11033-012-2072-3
44. Hough, S., Ascott-Evansm B., Brown, S., Cassim, B., De-Villiers, T., Lipschitz, S., ...Sonnendecker, E. W. W. (2010). NOFSA Guideline for the Diagnosis and Management of Osteoporosis. *Journal of Endocrinology. Metabolism and Diabetes of South Africa*, 15(3), Suplemento 1, 43-45.
45. Hutchinson, M. R., Bassett, M. H., & White, P. C. (2010). SCF, BDNF, and Gas6 are regulators of growth plate chondrocyte proliferation and differentiation. *Molecular Endocrinology*, 24(1), 193-203. doi: 10.1210/me.2009-0228.

46. Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341.
47. International Osteoporosis Foundation [IOF]. (2012). *Auditoría regional en América Latina: Epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012*. In J. Stenmark & L. Misteli (Eds.). Recuperado de: http://osteoporosisinlatinamerica.com/es/wp-content/uploads/2012/05/LA_Audit_final-ES.pdf
48. Izquierdo, M. (2008). *Biomecánica y bases neuromusculares de la actividad física y el deporte*. Madrid, España: Médica Panamericana.
49. Jeorger, M., & Gnant, M. (2012). *Prevention of bone metastases*. London, New York (pp. 54), Springer.
50. Jiménez, F., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
51. Kajiya, M., Shiba, H., Fujita, T., Ouhara, K., Takeda, K., Mizuno, N., ...Kurihara, H. (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 16259-16267. doi: 10.1074/jbc.M800668200.
52. Kühnel, W. (2005). *Atlas color de citología e histología* (11a ed.). España: Médica Panamericana.
53. Kung, A. W. C., Xiao, S. M., Cherny, S., Li, G. H., Gao, Y., Tso, G., ...Sham, P. C. (2010). Association of *JAG1* with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *The American Journal of Human Genetics*, 86, 229-239. doi: 10.1016/j.ahg.2009.12.014.
54. Leib, E., Lewiecki, E., Binkley, N., & Hamdy, R. (2004). Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *Journal of Clinical Densitometry*, 7(1), 1-6.

55. Li, D., & Wu, J. (2010). Association of the *MTHFR* C677T polymorphism and bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis. *Journal of Biomedical Research*, 24(6), 417–423.
56. Life Technologies Corporation. (2012). *Real-time PCR handbook*. Recuperado el 22 de julio de 2014 de: <http://find.lifetechnologies.com/qpcr/qpcrhandbook/ltfurl-lp/thank-you-2402CK-4087Q2.html>
57. Lin, G. L., & Hankenson, K. D. (2011). Integration of BMP, Wnt, and Notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(12), 3491–3501. doi:10.1002/jcb.23287.
58. Lindhe, J., Lang, N., & Karring, T. (2009). *Periodontología clínica e implantología odontológica* (5ª ed.). Buenos Aires, España: Médica Panamericana.
59. López-Chicharro, J., & López-Mojares, L. M. (2008). *Fisiología clínica del ejercicio*. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.
60. Lorenzo, P., Ladero, J. M., Leza, J. C., & Lizasoain, I. (2009). *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación* (3ª ed.). Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.
61. Manji, H. K., & Zarate, C. A. (2011). *Behavioral neurobiology of bipolar disorder and its treatment*. London, New York (pp. 173-174). Springer.
62. Márquez-Rosa, S., & Garatachea-Vallejo, N. (2009). *Actividad física y salud*. Madrid, España: Díaz de Santos.
63. Miján de la Torre, A. (2002). *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*. Barcelona, España: Glosa.
64. Miyao, M., Morita, H., Hosoi, T., Kurihara, H., Inoue, S., Hoshino, S., ...Ouchi, Y. (2000). Association of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcified Tissue International*, 66,190–194.

65. Monroe, D. G., McGee-Lawrence, M. E., Oursler, M. J., & Westendorf, J. J. (2012). Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*, 492(1), 1-18. doi: 10.1016/j.gene.2011.10.044
66. Morrison, N. A., Cheng-Qi, J., Tokita, A., Kelly, P. J., Crofts, L., Nguyen, T. V., ...Eisman, J. A. (1994). Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 367, 284-287. doi:10.1038/367284a0
67. Muñoz-Torres, M., Varsavsky, M., & Avilés-Pérez, M. D. (2010). Osteoporosis. Definición. Epidemiología. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2(Suplemento 3), S5-S7.
68. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2014a) *JAG1 jagged1 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado el 12 de Marzo de 2014 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/182>
69. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2014b) *MEF2C myocyte enhancer factor 2C [Homo sapiens (human)]*. Recuperado el 15 de marzo del 204 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4208>
70. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2014c) *dbSNP Short genetic variations. rs6265*. Recuperado el 28 de julio de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6265
71. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2014d) *dbSNP Short genetic variations. rs6514116*. Recuperado el 28 de julio de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6514116
72. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2014e) *dbSNP Short genetic variations. rs12521522*. Recuperado el 28 de julio de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs12521522
73. Negri, A. L., Spivacow, F. R., & Zanchetta, J. R. (1992). Osteoporosis inducida por corticoides. Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista Medicina Buenos Aires*, 52(3), 257- 264.

74. Neyro-Bilbao, J. L., Cano-Sánchez, A., & Palacios-Gil-Antuñano, S. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 3(2), 105-112.
75. Ng, M. Y. M., Sham, P. C., Paterson, A. D., Chan, V., & Kung, A. W. C. (2006). Effect of environmental factors and gender on the heritability of bone mineral density and bone size. *Annals of Human Genetics*, 70(4), 428-438.
76. Nobta, M., Tsukazaki, T., Shibata, Y., Xin, C., Moriishi, T., Sakano, S., ... Yamaguchi, A. (2005). Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 15842–15848. doi: 10.1074/jbc.M412891200.
77. Nolla-Solé, J. M. (1997). *Enfermedades óseas: Sociedad Española de Reumatología*. Barcelona, España: Masson.
78. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2003). *Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group* (World Health Organization Technical Reports Series; 921). Singapur.
79. Pierce, B. A. (2010). *Genética. Un enfoque conceptual* (3ª ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
80. Potthoff, M. J., & Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 134, 4131-4140. doi: 10.1242/dev.008367.
81. Rapuri, P. B., Gallagher, J. C., Karimi-Kinyamu, H., & Ryschon, K. L. (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(5), 694–700.
82. Riancho, J. A., & Gutiérrez, G. E. (2003). Factores reguladores de la resorción ósea. *Revista Metabolismo Óseo y Mineral*, 1(2), 51-66.

83. Riggs, B. L., & Melton L. J. (1992). The prevention and treatment of osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 327, 620-627. doi: 10.1056/NEJM199208273270908
84. Rivadeneira, F., Styrkársdóttir, U., Estrada, K., Halldórsson, B.V., Hsu, Y. H., Richards, J. B., ...Consortio de Factores Genéticos de la Osteoporosis [GEFOS]. (2009). Twenty bone mineral density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 41(11), 1199-1206. doi: 10.1038/ng.446.
85. Rodríguez-Merchán, E. C., Ortega-Andreu, M., & Alonso-Carro, G. (2003). *Fracturas osteoporóticas: prevención y tratamiento*. Madrid, España: Medica Panamericana.
86. Rojano-Mejía, D., Coral-Vázquez, R. M., Cortes-Espinosa, L., López-Medina, G., Aguirre-García, M. C., Coronell, A., & Canto, P. (2013). *JAG1* and *COL1A1* polymorphisms and haplotypes in relation to bone mineral density variations in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Age*, 35, 471-478. doi: 10.1007/s11357-011-9363-9
87. Roman-García, M. M., Garcés-Puentes, M. V., & Díaz-Curiel, M. (2002). Relación entre densidad mineral ósea y fracturas en mujeres postmenopáusicas de la Comunidad de Extremadura. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 11(4), 135-139.
88. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular* (5ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
89. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (3ª ed.). Nueva York, Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
90. Secretaria de Salud [SSA] (1988). *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*. Recuperado el 21 de marzo de 2013 de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>

91. Sekine, C., Koyanagi, A., Koyama, N., Hozumi, K., Chiba, S., & Yagita, H. (2012). Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis Research & Therapy*, *14*, R45. doi:10.1186/ar3758
92. Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J. Fernández-López, J. C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., ...Jiménez-Sánchez, G. (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(21), 8611-8616. doi: 10.1073/pnas.09030451068
93. Silverthorn, D. U. (2009). *Fisiología Humana: un enfoque integrado* (4^a ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
94. Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. (2010). *Manual de cirugía y traumatología. Tomo 1* (2^a ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
95. Sociedad Española de Reumatología (2010). *Manual de Enfermedades Óseas* (2^a ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
96. Styrkarsdottir, U., Halldorsson, B. V., Gudbjartsson D. F., Tang, N. L. S., Koh, J. M., Xiao, S., ...Stefansson, K. (2010). European bone mineral density loci are also associated with BMD in East-Asian population. *Plos ONE*, *5*(10), e13217. doi: 10.1371/journal.pone.0013217
97. Tamayo, J., Díaz, R., Lazcano-Ponce, E., Muñoz, M., Huitrón, G., Halley, E., ...Salmerón, J. (2009). Reference values for areal bone mineral density among a healthy mexican population. *Salud Pública de México*, *51*(suplemento 1), S56-S83.
98. Thakker, R.V., Whyte, M.P., Eisman, J.A., & Igarashi, T. (2013). *Genetics of bone biology and skeletal disease*. California, E.U.A.: Elsevier.
99. Thermo Fisher Scientific Inc. (2014). *Life technologies. SNP genotyping analysis using TagMan® assays*. Recuperado el 23 de Junio de 2014 de

<http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>

100. Valente Da Silva, H. G., Mendonça, L. M. C. , Conceição, F. L., Zahar, S. E. V., Farias, M. L. (2007). Influence of obesity on bone density in postmenopausal women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51(6), 943-949. doi: 10.1590/S0004-27302007000600008
101. Van-Meurs, J. B. J., Dhonukshe-Rutten, R. A. M., Pluijm, S. M. F., Van der-Kliff, M., De Jonge, R., Lindemans, J., ...Uitterlinden, A. G. (2004). Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *The New England Journal of Medicine*, 350(20), 2033–2041.
102. Velasco, J., & Riancho, J.A. (2008). La vía Wnt y el hueso. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 17(1), 5-9. doi: 10.1016/S1132-8460(08)71131-0
103. Velázquez-Cruz, R., García-Ortiz, H., Castilejos-López, M., Quiterio, M., Valdés-Flores, M., Orozco, L., ...Salmerón, J. (2014). *WNT3A* gene polymorphisms are associated with bone mineral density variation in postmenopausal mestizo women of an urban Mexican population: findings of a pathway-based high-density single nucleotide screening. *Age*, 36, 9635. doi: 10.1007/s11357-014-9635-2
104. Weizmann Institute of Science. (2013a). *Brian-derived neurotrophic factor*. Gene cards. The human gene compendium. Recuperado el 17 de Marzo de 2014 de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BDNF>
105. Weizmann Institute of Science. (2013b). *JAG1*. Gene cards. The human gene compendium. Recuperado el 12 de Marzo de 2014 de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAG1>
106. Weizmann Institute of Science. (2013c). *Myocyte Enhancer Factor 2C*. Gene cards. The human gene compendium. Recuperado el 14 de Marzo de 2014 de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEF2C>

107. Welsch, U. (2008). *Histología. (2ª ed.)*. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.
108. Wu, S., Liu, Y., Zhang, L., Han, Y., Lin, Y., & Deng, H. W. (2013). Genome-wide approaches for identifying genetic risk factors for osteoporosis. *Genome Medicine*, 5, 44. doi:10.1186/gm448
109. Yamashiro, T., Fukunaga, T., Yamashita, K., Kobashi, N., & Takano-Yamamoto, T. (2001). Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. *Bone*, 28(4), 404-409. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00405-7](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00405-7)
110. Zajícková, K., Zofková, I., Bahbouh, R., & Krepelová, A. (2002). Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: *FokI* genotype is related to postmenopausal bone mass. *Physiological Research*, 51, 501-509.
111. Zanchetta, J. R., & Talbot, J. R. (2001). *Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
112. Zanotti, S., & Canalis, E. (2012). Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcified Tissue International*, 90(2), 69–75. doi: 10.1007/s00223-011-9541-x.
113. Zheng, H. F., Duncan, E., Yerges-Armstrong, L. M., Eriksson, J., Bergström, U., Leo, P. J., ...Richards, J. B. (2013). Meta-analysis of genome-wide studies identifies *MEF2C* SNPs associated with bone mineral density at forearm. *Journal of Medical Genetics*, 50(7), 473-478. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101287.
114. Zhu, F., Sweetwyne, M. T., & Hankenson K. D. (2013). PKC δ is required for Jagged-1 induction of human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Stem Cells*, 31(6), 1181-1192. doi:10.1002/stem.1353

12. ANEXOS

ANEXO A. Carta de Consentimiento Informado

Monterrey, Nuevo León a _____ de _____ del año _____

Por medio de la presente Yo: _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado “Asociación de los polimorfismos de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF F* con densidad mineral ósea en mujeres de 40 a 80 años” que se realiza en la Facultad de Salud Pública y Nutrición y cuyos objetivos se centran en: Determinar la asociación de los genes *MEF2C*, *JAG1* y *BDNF* con Densidad Mineral Ósea (DMO) en mujeres de Monterrey y su área metropolitana. Se me ha informado que mi participación en este estudio consiste en: la toma de una muestra única de 5 ml de sangre, así como la realización de mediciones antropométricas y de la densitometría ósea (con el método DXA), que me permitirá conocer mi diagnóstico en cuanto a mi salud ósea.

Declaro que se me ha hecho saber sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación de este estudio, que son los siguientes: por la toma de la muestra de sangre, presentar algún hematoma (moretón) en el sitio de la toma de sangre. En la medición de la densitometría ósea se considera que no tiene efectos secundarios y sus riesgos son considerados mínimos.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que yo así lo desee.

El investigador principal confirma que no se me identificará en las publicaciones que se deriven de este estudio y que mis datos personales serán manejados de forma absolutamente confidencial. Para lo cual, el investigador utilizará un número de folio para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Nombre y firma del participante

Lic. Nut. Sandra Marlen González Peña
Cédula profesional: 7428759

Testigo 1

Testigo 2

ANEXO B. Invitación y reclutamiento de las pacientes



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Salud Pública y Nutrición
Centro de Investigación en
Nutrición y Salud Pública



Te invita a participar en la investigación:

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *JAGGED1*,
MEF2C Y *BDNF* CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES
MEXICANAS DE 40 A 80 AÑOS.**

En qué consiste:

- Se tomarán mediciones antropométricas (Peso y talla).
- Se tomará una muestra de sangre para las determinaciones genéticas.
- Se realizarán mediciones de densidad ósea, cuyo examen tiene un costo aproximado de \$650.00 **TOTALMENTE GRATIS**

Qué beneficios obtienes:

- > Conocerás tu estado nutricio actual (en base a tu Índice de Masa Corporal)
- > Conocerás el estado de tus huesos (si presentas osteoporosis o no)

Participación voluntaria
Sin costo
Previa cita

Informes: L.N. Sandra González Peña
Tel: (044) 8114800218
E-mail: licnut.sandragzz@gmail.com

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Salud Pública y Nutrición
Posgrado: Maestría en Ciencias en Nutrición
Av. Aguirre Pequeño y Yuriria, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México. C.P. 64430
Tel: 52(81) 13404890, ext. 1906 ; Fax: 52(81) 83486080



RESUMEN CURRICULAR

Lic. Nut. Sandra Marlen González Peña

Candidata para el Grado de Maestro en Ciencias en Nutrición

Tesis: ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MEF2C*,
JAG1 Y *BDNF* CON DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES DE 40 A 80
AÑOS

Campo de estudio: Nutrición molecular

Datos personales:

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León, México.

Fecha de nacimiento: 16 de Abril de 1989

Estado civil: Soltera

Nombre del padre: Martín González Aguilar

Nombre de la madre: Sandra Leticia Peña Macías

Formación académica: Licenciatura en Nutrición, egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León 2005-2011.

Experiencia profesional: Conferencias, asesorías y evaluación nutricional a niños, adolescentes y adultos en consulta privada desde el 2011 a la fecha.

Participación en congresos: 8

Reconocimientos: Primer Lugar en la categoría profesional en el V Congreso de Nutriología FaSPyN con el cartel titulado: "Variantes alélicas del gen *WNT3A* se asocian con densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas".