

HAPLOTIPOS DEL INTRÓN 1 DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO, PICO DE MASA ÓSEA Y RIESGO DE FRACTURAS OSTEOPORÓTICAS

J.A. RIANCHO, M.T. ZARRABEITIA, R. FRANCO-VICARIO
Y J. GONZÁLEZ-MACÍAS

SERVICIO DE MEDICINA INTERNA. HOSPITAL UNIVERSITARIO
MARQUÉS DE VALDECILLA Y UNIDAD DE MEDICINA LEGAL.
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA. SANTANDER. SERVICIO DE MEDICINA
INTERNA (RFV). HOSPITAL DE BASURTO. BASURTO (VIZCAYA).

Los estudios que han analizado la relación entre los polimorfismos del intrón 1 del receptor de estrógenos alfa y la masa ósea han dado resultados contradictorios. Recientemente se ha señalado que el análisis haplotípico tendría un mayor poder discriminante que el análisis alélico convencional. El objetivo de este estudio fue determinar si en nuestro medio existe relación entre la presencia del haplotipo Px y el pico de masa ósea o las fracturas osteoporóticas. Para ello se reanalizaron los datos obtenidos en un grupo de mujeres previamente estudiadas, en las que se amplificó una región del intrón 1 del receptor estrogénico mediante reacción en cadena de la polimerasa y se sometió posteriormente a digestión con las enzimas PvuII y XbaI. No se encontró relación entre la presencia o no del haplotipo Px y la masa ósea de las mujeres jóvenes sanas. Sin embargo, la frecuencia del haplotipo Px fue significativamente mayor en las mujeres con fractura de cadera que en las controles (*odds ratio* 2,7; intervalo de confianza [IC] 95% 1,1-6,9; $p = 0,03$). Estos resultados sugieren que, de existir aumento de riesgo en relación con la presencia del haplotipo Px, no se debe a que se alcance un pico de masa ósea menor, sino a una mayor pérdida tras la menopausia.

*Several studies about the relationship between estrogen receptor polymorphisms and bone mass have given conflicting results. It has recently been reported that haplotypic analysis is more discriminant than the allelic one. The aim of this study was to determine the relationship between Px haplotype and bone mass and fractures in our female population. A region in intron 1 of estrogen receptor alpha was amplified by PCR and digested with enzymes PvuII and XbaI. We did not find an association between bone mineral density of young women (i.e., peak bone mass) and the presence or the absence of Px haplotype. However, this haplotype was more common in women with hip fracture than in control women (*odds ratio* 2.7; CI 95% 1.1-6.9; $p = 0.03$). These results suggest that the presence of Px haplotype may be related to postmenopausal bone loss rather than peak bone mass.*

KEY WORDS: Osteoporosis, fractures, estrogen receptor.

PALABRAS CLAVE: osteoporosis, fracturas, receptor estrógenos.

INTRODUCCIÓN

La masa ósea, al igual que otras características del organismo, tiene un componente genético. Aunque la importancia relativa de los factores hereditarios y los ambientes en la osteoporosis no ha sido totalmente aclarada, se estima que entre un 40% y un 80% de la variabilidad de la masa ósea puede depender de factores genéticos¹⁻³. Los estrógenos desempeñan un importante papel en la homeostasis esquelética, tanto en mujeres como en varones⁴. De ahí que se haya explorado la posibilidad de que las diferencias en los receptores estrogénicos pudieran asociarse a diferencias en la masa ósea. En este sentido, varios autores han señalado que algunos alelos de regiones polimórficas del intrón 1 del receptor de estrógenos alfa (RE) se relacionan con diferencias en la densidad mineral ósea (DMO)⁵⁻⁷. Sin em-

bargo, estos resultados no han sido confirmados en otros estudios, incluidos los realizados por nuestro grupo⁸. Recientemente se ha señalado que el análisis de los haplotipos del gen del RE, determinados conjuntamente con las enzimas de restricción PvuII y XbaI tendría un poder discriminante superior al del análisis alélico convencional. En particular, se ha sugerido que las mujeres con haplotipo Px presentan una menor masa ósea⁹, de ahí que nos planteáramos este estudio con el objetivo de analizar si dicho haplotipo determina diferencias en el pico de masa ósea o el riesgo de fractura en nuestro medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los detalles del estudio se describen en una publicación previa en la que se analizó la relación entre la masa ósea y los alelos del receptor de la vitamina D y de estrógenos⁸.

SUJETOS

La población estudiada se compuso de los siguientes grupos:

- 1) Una muestra de convivencia de 53 mujeres jóvenes sanas de 18-34 años (media 26), seleccionadas entre estudiantes de Medicina y personal hospitalario.
 - 2) Sesenta y seis mujeres postmenopáusicas control de 43-85 años (media 61), sin fracturas, bien sanas (seguidas rutinariamente sin tratamiento hormonal en una consulta de menopausia), bien con coxartrosis.
 - 3) Cuarenta y una mujeres ingresadas por fractura de cadera (66-96 años; media 84).
 - 4) Setenta y seis mujeres con osteoporosis postmenopáusica y fractura vertebral, de 43-85 años (media 68), seguidas en nuestra consulta de osteoporosis.
- En las mujeres jóvenes se midió la DMO en columna lumbar (L2-L4) y cuello de fémur, mediante un densitómetro de rayos X Hologic QDR 1000.

ANÁLISIS GENÉTICO

Se obtuvo ADN de sangre periférica mediante un método comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (Quiagen, Hilden, Alemania). Se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

Financiado en parte con una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias (95/0288).

Correspondencia: J.A. Riancho.
Servicio de Medicina Interna.
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
39008 Santander.
Correo electrónico: mirrmj@humv.es

con un termociclador Perkin-Elmer 2400, una región del gen del RE que contiene los sitios de corte de las enzimas XbaI y PvuII. Los reactivos incluían 10⁻¹ de la solución de ADN; 1,5 mM MgCl₂, 2U de Taq polimerasa; 0,2 mM dNTPs y los amplímeros siguientes:

5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTC-CTATTCTCC-3' y

5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTC-GATTATCTGA-3'

Después de una desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, los tubos se sometieron a 30 ciclos de amplificación (94° C durante 15 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72° C durante 30 segundos) y una extensión final a 72° C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se digirieron en las enzimas durante 2 horas. Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. Los alelos que contenían el sitio de restricción se designaron con letras minúsculas; los que no lo poseían con mayúsculas (fig. 1). En una fracción del 10% de las muestras tomadas al azar se repitió el análisis. La reproducibilidad fue perfecta en todo los casos.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se dividieron las mujeres según presentaran o no el haplotipo Px. Se excluyeron del análisis las que tenían un genotipo ambiguo que no permitía identificar el haplotipo con seguridad (tabla 1).

Se analizaron las diferencias en la DMO mediante la «t» de Student. Se analizaron las diferencias en las frecuencias de los haplotipos entre las mujeres con fracturas osteoporóticas (tabla 2) y las controles pre y postmenopáusicas mediante la prueba de Chi cuadrado. Puesto que no había diferencias significativas entre ambos subgrupos control se consideraron conjuntamente, a fin de aumentar la potencia estadística. Se calcularon las *odds ratios* y su intervalo de confianza con el programa estadístico EpiInfo 6.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias entre las mujeres jóvenes sin haplotipo Px y con él

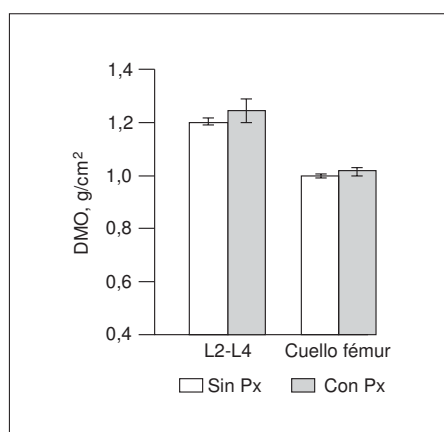


Fig. 1. Fragmentos resultantes de la digestión con PvuII y XbaI. Las muestras 1 a 4 corresponden a genotipos PpXx, PpXX, PPXx y PPXX, respectivamente.

en cuanto al índice de masa corporal (21 ± 2 kg/m² en ambos subgrupos) o la DMO (fig. 2). Los índices T fueron $-0,4 \pm 1,0$ y $-0,2 \pm 1,1$, respectivamente.

Sin embargo, el haplotipo Px tendió a ser más frecuente en las mujeres con fracturas que en las controles (tabla 2), aunque sólo alcanzó significación estadística en el caso de las fracturas de cadera ($p = 0,03$). La *odds ratio* de la asociación entre la presencia del haplotipo Px y las fracturas de cadera fue de 2,7 (IC 95% 1,1-6,9).

DISCUSIÓN

El gen del RE-alfa está situado en el cromosoma 6. Contiene 8 exones y tiene un tamaño de unas 140 kilobases. Los polimorfismos A-G y T-C aquí analizados se encuentran en el intrón 1, a 350 y 400 pares de bases, respectivamente, del exón 2. La posible relación entre los polimorfismos del RE y la masa ósea es controvertida. Algunos autores han encontrado una menor masa ósea en las mujeres con alelos «P»^{5,10}, pero otros no han confirmado esos hallazgos¹¹. Nosotros mismos no hemos encontrado relación entre los alelos determinados por las enzimas PvuII y XbaI y el riesgo de fractura, cuando se analizan esos *loci* por separado⁸. En el presente estudio, al reanalizar los datos según los haplotipos resultantes de considerar conjuntamente ambos *loci*, encontramos que las mujeres con fracturas de cadera tenían una mayor frecuencia del haplotipo Px.

Así, nuestros resultados son concordantes con los de Albarga et al⁹. Estos autores es-

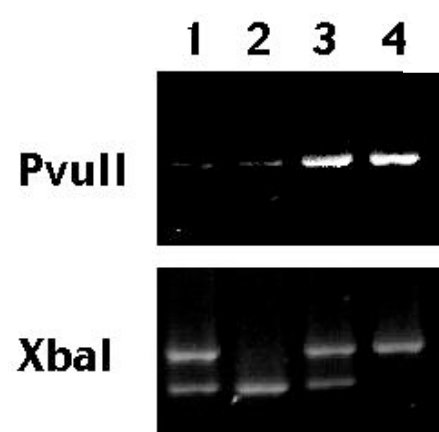


Fig. 2. Densidad mineral ósea en columna lumbar y cuello de fémur en mujeres jóvenes, dependiendo de que presentaran o no el haplotipo Px. DMO: densidad mineral ósea.

tudiaron un grupo de mujeres escocesas con una edad media de 64 años y encontraron que la DMO en columna lumbar y cuello de fémur era significativamente menor en las que presentaban el haplotipo Px (estando la amplitud de la diferencia en torno a 0,5 desviaciones estándar). Es interesante que en ese estudio tampoco se hallaron diferencias significativas en la masa ósea cuando se consideraban por se-

Tabla 1

Análisis de la presencia del haplotipo Px a partir de los genotipos determinados por las enzimas PvuII y XbaI. Las mujeres con genotipo PpXx fueron excluidas del análisis por no poder estimarse con certeza sus haplotipos

Genotipos	Haplotipos	Número de haplotipos Px
PPXX	PX+PX	0
PpXX	PX+pX	0
ppXX	pX+pX	0
PPXx	PX+Px	1
PPxx	Px+Px	2
PpXx	PX+px/Px+pX	¿?
Ppxx	Px+px	1
ppXx	pX+px	0
ppxx	px+px	0

Tabla 2

Frecuencias haplotípicas en las mujeres postmenopáusicas control y en las osteoporóticas

	Sin Px	Con Px
Controles	57 (84%)	11 (16%)
Fractura vertebral	35 (69%)	16 (31%)
Fractura de cadera	14 (54%)	12 (46%)

parado ambos *loci*, aun cuando existe un marcado desequilibrio de unión entre ellos (la presencia de alelos «P» tiende a asociarse con los «X», y los «p» con los «x»). En contra de lo señalado por otros autores⁶, el hecho de que no encontremos diferencias entre la DMO de las mujeres jóvenes con haplotipo Px y sin él sugiere que en nuestro medio el aumento del riesgo de fracturas en las portadoras del haplotipo Px no estaría en relación con un menor pico de masa ósea, sino con disminuciones posteriores de la misma.

El mecanismo responsable de estas asociaciones es desconocido. Dado que a menudo los intrones incluyen regiones moduladoras de la síntesis de ARN, algunos autores han sugerido que los alelos P representarían secuencias con menor afinidad por ciertos factores de transcripción, pero no está claramente demostrado que el intrón 1 del RE desempeñe un papel regulador de la transcripción. Más bien, la asociación del haplotipo Px con menor masa ósea y fracturas, en ausencia de relación con los alelos respectivos considerados aisladamente, apunta la posibilidad de que exista un desequilibrio de unión entre estos haplotipo y otras secuencias polimórficas, en el propio gen del RE o de otros genes próximos, que sean las realmente influyentes en el balance esquelético. De hecho, se ha descrito la existencia de un de-

sequilibrio de unión entre los alelos del intrón 1 aquí analizados y una secuencia polimórfica repetitiva en tándem TA del promotor del gen del RE. Sin embargo, la relación entre los alelos en esta región repetitiva y la masa ósea es también controvertida^{9,11}.

En conclusión, los polimorfismos del intrón 1 del RE parecen asociarse a diferencias en el riesgo de fracturas osteoporóticas, de manera que las mujeres con haplotipo Px presentan un mayor riesgo de fractura de cadera. No obstante, se necesitan estudios más amplios para confirmar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? *Am J Epidemiol* 1998; 147: 3-16.
2. Sowers MR, Galuska DA. Epidemiology of bone mass in premenopausal women. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 374-98.
3. Seeman E, Hopper JL, Bach LA, Cooper ME, Parkinson E, McKay J, et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 554-8.
4. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056-61.
5. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 306-11.
6. Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, Soda M, Tokizawa T, Kagami I, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone* 1997; 27: 379-83.
7. Genari L, Bechemi L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, et al. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 939-44.
8. Zarrabeitia MT, Riancho JA, Franco-Vicario R, Goiria J, Gonzalo C, González-Macias J. Papel de la tipificación genética múltiple (receptores de vitamina D y estrógenos) en la determinación del riesgo de fractura. *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 241-4.
9. Albagha OME, McGuigan FEA, Reid DM, Ralston SH. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 128-34.
10. Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Saarikoski S, et al. Early postmenopausal bone loss is associated with PvuII estrogen receptor gene polymorphism in Finnish women: effect of hormone replacement therapy. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 315-21.
11. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first intron are not. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2222-30.