




Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**ESTUDIO GENETICO DE LA  
OSTEOPOROSIS: HEREDABILIDAD DE LAS  
PROPIEDADES DENSITOMÉTRICAS,  
ESTRUCTURALES Y DE RESISTENCIA  
ÓSEA.**

**Nerea Hernández de Sosa**

**TESIS DOCTORAL**

**Programa de doctorado en Medicina**

**Universitat Autònoma de Barcelona 2016**

**TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL:**

**ESTUDIO GENETICO DE LA OSTEOPOROSIS:  
HEREDABILIDAD DE LAS PROPIEDADES  
DENSITOMÉTRICAS, ESTRUCTURALES Y DE  
RESISTENCIA ÓSEA.**

Tesis presentada por Nerea Hernández de Sosa para optar al título  
de doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Director: Dr. Jordi Casademont i Pou.

Departamento de Medicina.  
Facultad de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Barcelona, Año 2016

El Doctor Jordi Casademont i Pou, Profesor Titular del Departament de Medicina de la UAB y Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

## CERTIFICA

Que la memoria titulada: “Estudio genético de la osteoporosis: Heredabilidad de las propiedades densitométricas, estructurales y de resistencia ósea”, presentada por Nerea Hernández de Sosa, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para ser leída delante del Tribunal correspondiente.

Firmado: Jordi Casademont i Pou

Doctorando: Nerea Hernández de Sosa

Barcelona, 8 de Julio de 2016

## I. PRESENTACIÓN:

La presente Tesis Doctoral se ha estructurado siguiendo la Normativa Interna de la Universitat Autònoma de Barcelona para la presentación de la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones, aprobada por la Comisión de Doctorado de dicha Universidad en el año 2009.

Esta tesis está formada por una serie de trabajos que pertenecen a una misma línea de investigación dirigida al estudio de la base genética de la osteoporosis en familias con genealogía extendida. Los resultados obtenidos se han recogido en 2 artículos publicados en revistas de difusión internacional:

- Heritability of Bone Mineral Density in a Multivariate Family-Based Study.” **Nerea Hernandez-de Sosa**<sup>1</sup>, Georgios Athanasiadis<sup>2</sup>, Jorge Malouf<sup>1</sup>, Ana Laiz<sup>1</sup>, Ana Marin<sup>1</sup>, Silvia Herrera<sup>1</sup>, Jordi Farrerons<sup>1</sup>, Jose Manuel Soria<sup>2</sup>, Jordi Casademont<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departament of Internal Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona. Spain. <sup>2</sup>Departament of Genomics of Complex Diseases, Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. *Calcified Tissue International*, 2014. Vol 94(6):590-596. (FI: 3.272 )

- Genetic Contribution on Femoral Neck Bone Geometry to the Risk of Developing Osteoporosis. A Family-Based Study. **Nerea Hernandez-de Sosa**<sup>1</sup>, Georgios Athanasiadis<sup>2</sup>, Jorge Malouf<sup>1</sup>, Ana Laiz<sup>1</sup>, Ana Marin<sup>1</sup>, Silvia Herrera<sup>1</sup>, Jordi Farrerons<sup>1</sup>, Jose Manuel Soria<sup>2</sup>, Jordi Casademont<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departament of Internal Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona. Spain. <sup>2</sup>Departament of Genomics of Complex Diseases, Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. *PLoS ONE*. 2016. Vol 11(5): e0154833. (FI: 3.234)

**A mi family,**

## II. AGRADECIMIENTOS:

A todos los componentes del proyecto GAO, gracias a la aportación de cada uno (granito a granito) este proyecto ha sido posible y sigue desarrollándose y avanzando. Especialmente a todas las familias, a cada paciente e hijo/a incluidos, su disponibilidad, colaboración e ilusión.

A la gran Unidad de Metabolismo óseo del Servicio de Medicina Interna, debido a la perseverancia de cada uno de sus componentes, a la ingeniosidad de todos y al compañerismo en todos los momentos y situaciones. No sabría por donde empezar ni encontrar las palabras adecuadas para conseguir plasmar todo lo que he sentido, siento y espero poder seguir sintiendo trabajando día a día junto a vosotros.... satisfacción de tener unos profesionales a mi lado indescriptibles, de unos compañeros excelentes tanto en los malos como en los buenos momentos, sentimiento de poder contar con vosotros para todo y, sobre todo, vuestra perseverancia y paciencia conmigo... A Jorge Malouf; sin sus clases magistrales, sin su paciencia ante mi ignorancia y sin su disponibilidad en todo momento, ninguna de las líneas de esta tesis hubiese estado escrita.

A Jordi Casademont, nuestro jefe del Servicio y director de la presente Tesis; sin su ayuda, paciencia, comprensión y excelencia no habría conseguido acabar este proyecto.

A la Unidad de Genética, especialmente a JM Soria y G. Athanasiadis que han resuelto mis dudas continuas sobre el mundo de la genética y heredabilidad. Gracias a todo el equipo este proyecto esta siendo posible.

A todo el Servicio de Medicina Interna, a cada uno de los compañeros/as de consultas, del Hospital de Día, de Geriatria, de Infecciosas, de Reumatología, de Hospitalización, de Administración... por haber sido y ser mi familia profesional, que me ha visto crecer, que me ha acompañado, que me ha sufrido en mi viaje de internista. Espero seguir compartiendo el día a día con todos vosotros con la misma ilusión que el primero. Especialmente a los que me soportan cada mañana tras "el pase", ante un nuevo día lleno de incertidumbres....

A los compañeros de urgencias; sin ellos no me hubiese convertido en lo que soy y con ellos espero seguir convirtiéndome en lo que seré.

A todas las compañeras y amigas del Hospital de Plasencia que me han ayudado y con los que espero seguir compartiendo penas y alegrías a lo largo de mi vida.

A mi familia y amigos; sin su paciencia, amor y comprensión, nada de todo esto hubiese sido factible. Sin sus pilares yo no estaría aquí. A mi ama y aita; sin su eterno apoyo sin límite desde mi infancia tanto en la vida, en el amor y en la confianza en mí, no me hubiese convertido en lo que soy. A mi hermanito Koldo con su presencia perpetua e incondicional, con el sentimiento de que para siempre y lo que necesite, no existen palabras.

A mi gran pilar, a mi novio, a mi pareja, a mi marido, a mi compañero, a mi maiti, a Alberto; sin él, sin su apoyo incondicional no hubiese empezado ni acabado este proyecto. Por los buenos momentos y por los que espero que estén por venir.

A mis hijos perdón por el tiempo robado pero sin su fuerza nada de esto seria factible....

Muchas gracias a todos vosotros.



### III. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

ADN: ácido desoxiribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

BR: bukling ratio (tasa de pando).

cm: centímetros.

CSA: cross-sectional area (área de la sección transversal).

CSMI: cross-sectional moment of inertia (momento de inercia de la sección transversal).

CT: cortical Thickness (grosor cortical).

DMO: densidad mineral ósea.

DS: desviación estándar.

DXA: absorciometría de doble energía.

FNGPs: Parámetros geométricos del cuello femoral.

FS: Femoral Shaft (diáfisis femoral).

GAO: Genetic analysis Osteoporosis project (Proyecto de Análisis Genético en Osteoporosis).

GENOMOS: Genetic markers for Osteoporosis.

GWAS: estudio de asociación a gran escala.

g/cm<sup>2</sup> gramos por centímetro cuadrado.

HAL: Hip axis length (longitud del eje de la cadera).

HSA: Hip Structural Análisis.

H<sup>2</sup>: heredabilidad.

IBD: identidad por descendencia.

IMC: índice de masa corporal.

ISCD: International Society for Clinical Densitometry.

IT: intertrocantérea.

L: columna vertebral lumbar.

LOD: log of the odds score (logaritmo de odds).

mg: miligramos.

miRNA: micro de ácido ribonucleico (ácido ribonucleico monocatenario).

mm: milímetros.

n: número de individuos.

NN: Narrow neck (cuello femoral).

NSA: Neck-shaft angle (ángulo del eje del cuello).  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.  
 $\rho_e$ : correlación ambiental.  
 $\rho_G$ : correlación genética.  
 $\rho_p$ : correlación fenotípica.  
Propositus: individuo afecto.  
PTH: Hormona paratiroidea.  
QTC: tomografía cuantitativa computacional.  
QUS: ultrasonidos cuantitativos.  
RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear B-Kappa.  
TDT: Test de desequilibrio de la transmisión.  
THS: Terapia Hormonal Sustitutiva.  
S: Shaft (diáfisis).  
SERMs: Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos.  
SNPs: polimorfismo de un cambio puntual de un solo nucleótido.  
UI: Unidades Internacionales.  
W: neck width (ancho del cuello femoral).  
Z: section modulus (módulo de sección).

## ÍNDICE

PRESENTACIÓN I.....	4
AGRADECIMIENTOS II .....	5
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS III .....	8
ÍNDICE .....	10
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. LA OSTEOPOROSIS .....	12
1.1.1. DEFINICIÓN .....	12
1.1.1.1. DENSIDAD MINERAL ÓSEA .....	13
1.1.1.2. PARAMETROS GEOMÉTRICOS DEL CUELLO FEMORAL .....	14
1.1.2. DIAGNÓSTICO .....	17
1.1.3. EPIDEMIOLOGIA .....	19
1.1.4. FACTORES DE RIESGO .....	19
1.1.5. PREVENCIÓN .....	21
1.1.6. TRATAMIENTO .....	22
1.2. GENÉTICA DE LA OSTEOPOROSIS .....	24
1.2.1. ESTUDIO DEL COMPONENTE GENÉTICO .....	25
1.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES CAUSANTES DE LA OSTEOPOROSIS Y ESTUDIOS FUNCIONALES .....	27
1.2.3. ESTUDIOS GENÉTICOS CON FENOTIPOS OSTEOPORÓTICOS .....	31
2. HIPÓTESIS .....	33
2.1. HIPÓTESIS GENERAL	
2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICA	
3. OBJETIVOS .....	34
3.1. OBJETIVOS GENERALES.	
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	

4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	35
5. RESULTADOS .....	41
5.1. ARTICULO I .....	41
5.2. ARTICULO II .....	51
6. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	65
6.1. RELEVANCIA .....	68
7. CONCLUSIONES .....	69
8. BIBLIOGRAFÍA .....	70
9. ANEXOS .....	79

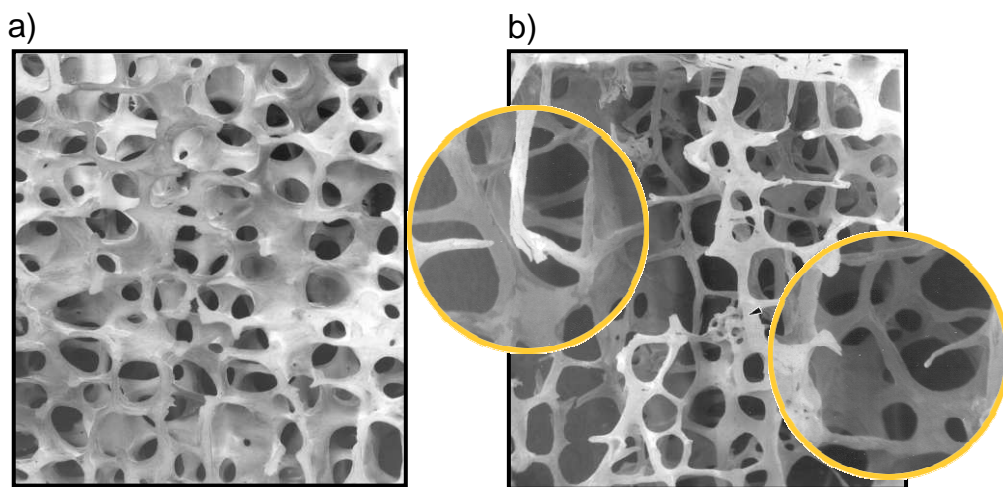
## 1. INTRODUCCIÓN:

### 1.1. LA OSTEOPOROSIS:

#### 1.1.1. DEFINICIÓN:

La osteoporosis es una enfermedad generalizada del esqueleto que está caracterizada por una baja masa ósea y alteraciones en su microarquitectura. Ello conlleva fragilidad ósea e incremento de riesgo de fractura, sobre todo de cadera, vertebras y muñeca [Kanis, 1997] (Figura 1).

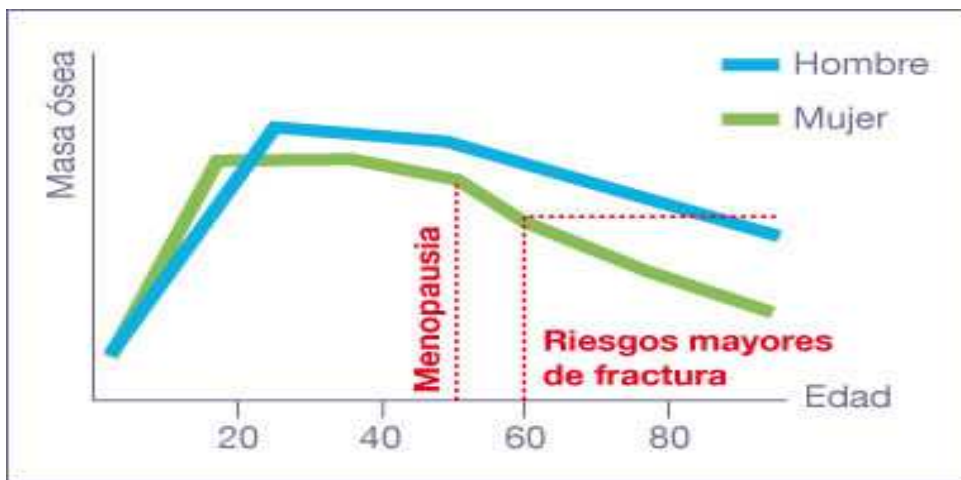
Figura 1. Arquitectura tridimensional del hueso trabecular. a) hueso normal. b) hueso osteoporótico.



La osteoporosis aparece por una alteración del remodelado óseo caracterizado por un recambio óseo mayor y un balance óseo total negativo [Janssens, 2002]. La masa ósea es la cantidad de hueso que presenta una persona en un determinado momento y varía en el transcurso de su vida. Está determinada por el desarrollo de su masa ósea máxima (pico de masa ósea) que suele alcanzarse entre los 25 y los 35 años. El pico de masa ósea varía

entre sexos, entre personas del mismo sexo y una vez alcanza el pico, la masa ósea empieza a disminuir de manera asintomática. En los primeros años tras la menopausia disminuye considerablemente debido a la disminución de los estrógenos. Cuando la masa ósea llega a un definido umbral de fractura, el riesgo de padecer fractura por fragilidad aumenta considerablemente (Figura 2).

Figura 2. Evolución masa ósea a lo largo de la vida.



Existen múltiples estudios que demuestran la importancia de la contribución genética en la variación de la masa ósea y en el desarrollo del pico masa ósea [Styrkarsdottir, 2007]. Pero los factores ambientales como la actividad física, estilo de vida y la ingesta de calcio también parece que afectan a la densidad ósea de forma significativa [Berard, 1997; Simkin, 1987; Kiel, 1996].

#### 1.1.1.1. DENSIDAD MINERAL ÓSEA:

El valor de la densidad mineral ósea (DMO) sirve para estimar la cantidad ósea y se expresa en gramos por centímetro cuadrado ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). La cuantificación de la DMO se puede realizar con diversas técnicas

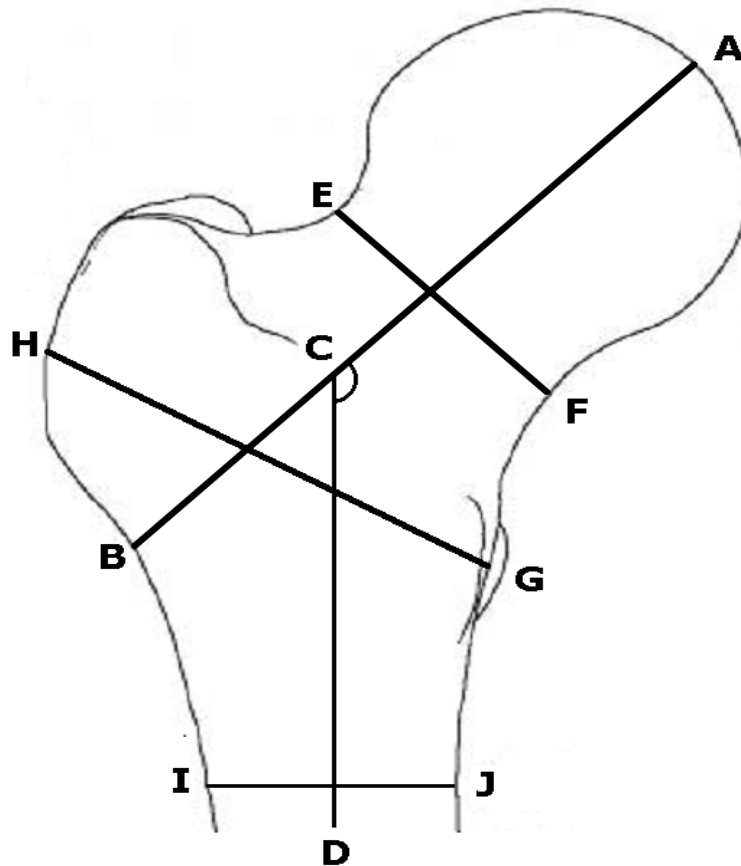
densitométricas indoloras y no invasivas. La más utilizada es la absorciometría de doble energía de rayos X (DXA). Esta técnica consiste en un haz de radiación de baja energía que disminuye al interaccionar con la materia que atraviesa. Se puede realizar la medición de la DMO de cuerpo entero o diversas localizaciones como la femoral, muñeca y lumbar entre las vértebras lumbares L1 a L4. Otras técnicas de medición son la tomografía computarizada cuantitativa (QTC) y los ultrasonidos cuantitativos (QUS).

En la actualidad, la DMO es la que pronostica el riesgo de fractura osteoporótica en la práctica clínica. Los estudios dejan entrever que la reducción de una desviación estándar (DS) de la masa ósea en la columna vertebral, la cadera o la muñeca, está asociada aproximadamente a una duplicación del riesgo de fractura.

#### **1.1.1.2. PARÁMETROS GEOMÉTRICOS DEL CUELLO FEMORAL:**

Los parámetros geométricos del cuello femoral (FNGPs) son medidas de las propiedades estructurales óseas femorales. Entre ellas destacan la forma, el tamaño y el ángulo. Se han descrito como predictores de riesgo de fractura independiente, tal como ocurre con la DMO [Melton, 2005].

**Figura 3.** Parámetros geométricos del cuello femoral. Rasgos estructurales: AB es la longitud del eje de la cadera (Hip Axis length: HAL), ACD es el ángulo del eje del cuello femoral (Femoral neck-shaft angle: NSA), EF es la distancia del cuello femoral (Narrow Neck: NN), HG es la distancia intertrocantérea (Intertrochanteric: IT) y IJ es la distancia de la diáfisis femoral (Femoral Shaft: FS).

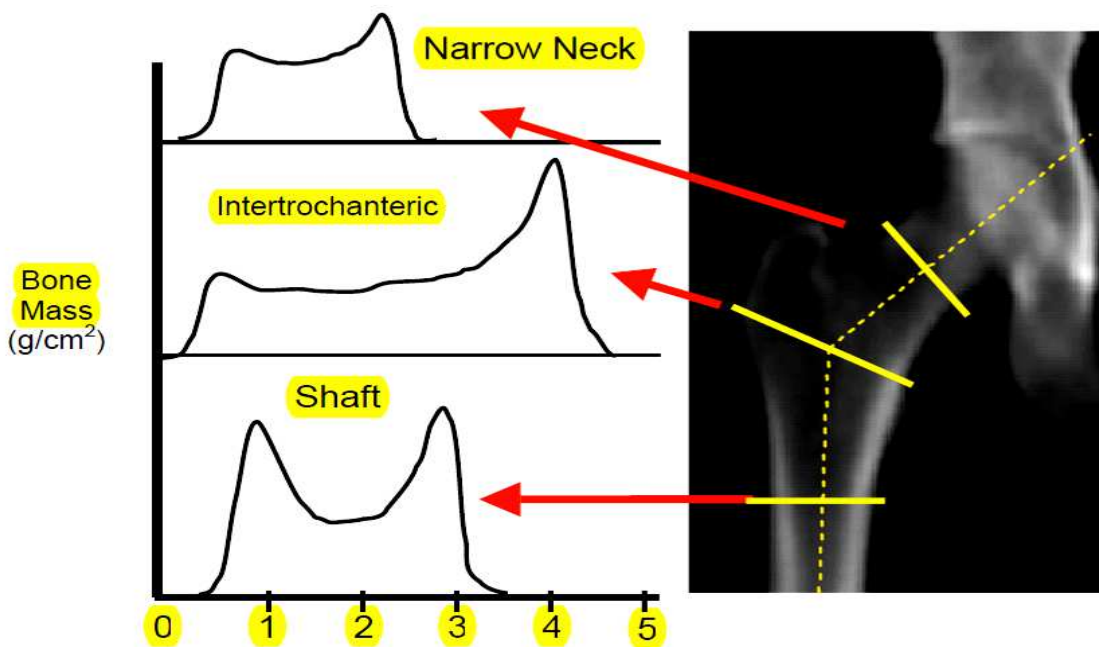


El método considerado de referencia para la medición de los parámetros histomorfométricos del fémur proximal es la biopsia ósea. Por razones obvias, la biopsia ósea no se puede utilizar de forma rutinaria en la práctica clínica diaria, por lo que se han desarrollado métodos alternativos. Los mejores métodos para la determinación de los FNGPs de manera no invasiva requieren tecnologías de imagen y análisis complejos basados en la tomografía computacional cuantitativa y análisis de elementos finitos. Son técnicas que requieren altas dosis de radiación y son muy costosas [Danielson, 2013; Keaveny, 2008]. Actualmente, mediante la DXA, se puede realizar la medición de estos parámetros y los análisis, también complejos, se ven facilitados mediante un programa denominado Hip Structural Analysis (Figura 4 y 5). Debido a la realización del análisis en dos dimensiones la resolución de las dimensiones estructurales suele ser menor [Beck, 2006]. Pero se considera un método aceptable para la medición de la resistencia y propiedades geométricas



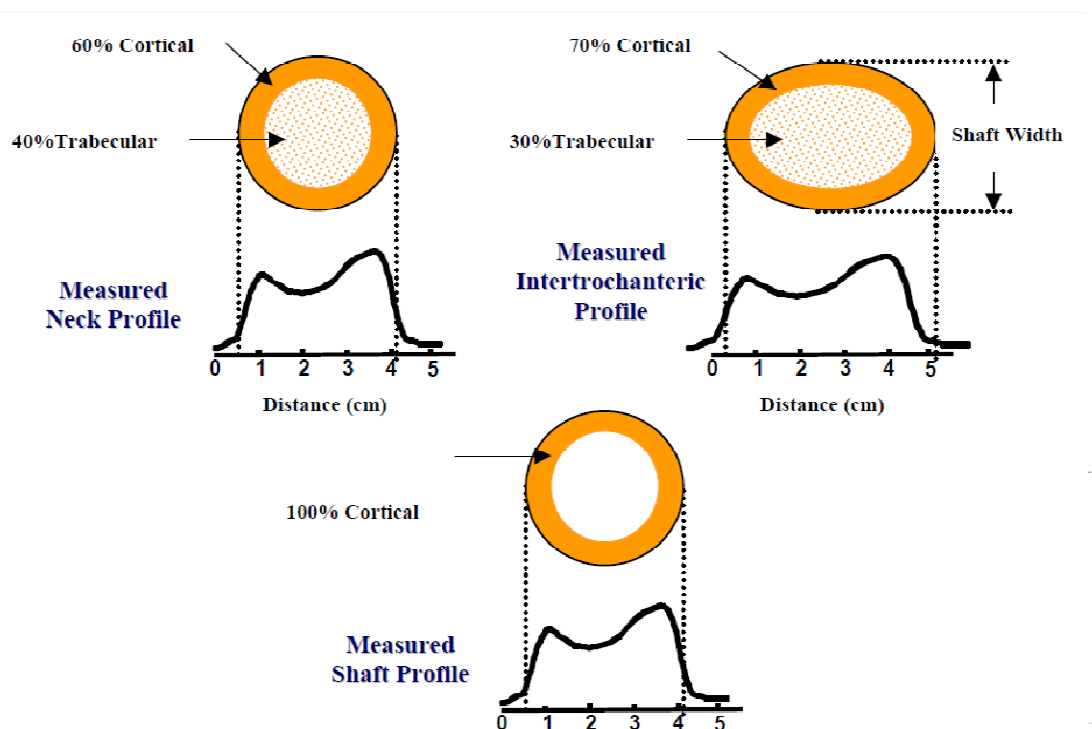
de la cadera en la práctica clínica diaria, debido a las ventajas que representa un coste y radiación bajos comparado con la tomografía computacional cuantitativa [Genant, 1996; Kalender, 1992].

Figura 4. Imagen de cadera obtenida de un escáner HOLOGIC DXA. Se describen las diferentes regiones femorales analizadas a través de elementos finitos: cuello femoral (región NN), intertrocantérea (region IT) y diáfisis (región S). A la izquierda se muestran perfiles de masa ósea típicos usados en las mediciones de propiedades geométricas.



1Versions of the Hip Structural Analysis (HSA) Program (BMD and Structural Geometry Methodology) As Used to Create NHANES III Dataset October 29, 2002 Thomas J. Beck, ScD Johns Hopkins University, School of Medicine The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Sciences 601 North Caroline Street Baltimore, MD 21287-0849

Figura 5. Los perfiles de masa ósea cortical y trabecular de las medidas de las propiedades geométricas utilizadas de cada región del programa HSA.



*1Versions of the Hip Structural Analysis (HSA) Program (BMD and Structural Geometry Methodology) As Used to Create NHANES III Dataset October 29, 2002 Thomas J. Beck, ScD Johns Hopkins University, School of Medicine The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Sciences 601 North Caroline Street Baltimore, MD 21287-0849*

### 1.1.2. DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS:

Para la medición de la DMO, la International Society for Clinical Densitometry (ISCD) aconseja determinar la masa ósea de la columna vertebral (L1-L4) además de la masa ósea de la cadera (cuello femoral, cadera total y troncánter) [Hamdy, 2002].

La Organización Mundial de la Salud (OMS), mediante la estandarización de los valores de densidad mineral ósea, definió en el año 1994 las siguientes categorías de diagnóstico de la osteoporosis (Tabla 1):

- BAJA MASA OSEA/OSTEOPENIA: disminución ligera de la DMO, entre -1 y -2.5 desviaciones estándar (DS) (T-score) respecto la densidad mineral ósea media de la población de adultos jóvenes del mismo sexo.
- OSTEOPOROSIS: disminución de la DMO de más de -2.5 DS (T-score) respecto la DMO media de la población del mismo sexo, adulta y sana o de -1DS respecto a DMO media de la población del mismo sexo y edad (Z-score).
- OSTEOPOROSIS ESTABLECIDA: estado de un individuo que, además de padecer osteoporosis, ha sufrido una o más fracturas osteoporóticas.

La fragilidad ósea es la predisposición a padecer fracturas tras un traumatismo de intensidad mínima, como tras caerse sobre la misma altura de una persona. Las fracturas osteoporóticas pueden afectar cualquier parte del esqueleto excepto el cráneo, y las más frecuentes son las del antebrazo distal (Fractura de Colles), las de las vértebras torácicas y lumbares y las del fémur proximal (fractura de cadera) [Kanis, 1994].

**Tabla 1. DEFINICIÓN DENSITOMÉTRICA DE LA OSTEOPOROSIS (OMS).**

<b>Valor de DMO* en índice T-score</b>	<b>Categoría diagnóstica</b>
Por encima de -1	Normal
Entre -1 y -2.5	Baja masa ósea/Osteopenia
Inferior -2.5	Osteoporosis
Inferior -2.5 y con fracturas de fragilidad	Osteoporosis establecida (“grave”)

\*OMS: Organización Mundial de la Salud; \*DMO: densidad mineral ósea; Los valores se refieren como índice T-score, que representa el número de desviaciones estándar que se aparta el sujeto respecto a la media de los valores de un grupo poblacional de adultos jóvenes del mismo sexo.

### **1.1.3. EPIDEMIOLOGIA:**

La osteoporosis es un problema sanitario de gran importancia debido a ser una enfermedad común con una repercusión clínica, social y económica importante [Oden, 2013]. Se estima que hay unos 200 millones de individuos afectados en el mundo [Lin, 2004] que desarrollan 9 millones de fracturas osteoporóticas anuales [Burge, 2007]. Un 15-30% de las mujeres y un 8% de los hombres caucásicos mayores de 50 años la padecen. En los casos de las mujeres mayores de 70 años, aumenta hasta un 50%. Un 30-50% de mujeres y un 15-30% de hombres sufrirán una fractura osteoporótica a lo largo de su vida [Sambrook, 2006]. Se considera una enfermedad en gran medida asintomática, porque aproximadamente dos tercios de las fracturas vertebrales no dan síntomas [Ray, 1997; Cooper, 1992]. Para cuando una mujer sufre su primera fractura osteoporótica, puede haber perdido ya aproximadamente entre el 20-30% de su masa ósea, fundamentalmente en los primeros 10 años tras menopausia [Riggs, 1998].

La fractura de cadera es reconocida como la fractura osteoporótica más grave por asociarse a importante morbilidad, a una disminución de la capacidad funcional y hasta a un 20% de mortalidad en el primer año [Faulkner, 2006; Lyles, 2008].

### **1.1.4. FACTORES DE RIESGO:**

Son las variables que favorecen la aparición de osteoporosis e incrementan el riesgo de padecer fracturas por fragilidad. Los estudios epidemiológicos han examinado los factores de riesgo que están asociados a una masa ósea baja y fracturas por fragilidad. En la tabla 2 se describen los principales factores de riesgo de osteoporosis y fracturas relacionadas definidos por la National Osteoporosis Foundation [Anonymous, 1998].

**Tabla 2.**

**Principales factores de riesgo de osteoporosis y fracturas relacionadas en las mujeres posmenopáusicas:**

Antecedentes personales de fractura atraumática en la edad adulta  
Antecedentes de fractura por fragilidad en un familiar de primer grado  
Peso corporal bajo (aproximadamente <58 Kg)  
Tabaquismo actual  
Uso de tratamiento con corticoesteroides orales

**Factores de riesgo adicionales**

Raza caucásica  
Edad avanzada  
Sexo femenino  
Demencia  
Hipoestrogenismo (menopausia precoz (<45 años) u ovariectomía bilateral; amenorrea premenopáusica prolongada (>1año)  
Bajo consumo de calcio (durante toda la vida)  
Alcoholismo  
Mala vista pese a una corrección suficiente  
Actividad física insuficiente  
Mala salud/debilidad

Los factores de riesgo de fractura del fémur proximal se examinaron en el Study of Osteoporotic Fractures, que realizó el seguimiento de 9.704 mujeres posmenopáusicas mayores de 65 años (Tabla 3).

Los investigadores determinaron que muchos factores contribuyen de forma independiente al riesgo de fractura. Entre ellos cabe destacar la edad, antecedentes maternos de fractura del fémur proximal, peso corporal bajo, estatura, mala salud, hipertiroidismo previo, mala percepción visual de la profundidad, taquicardia, fracturas previas, masa ósea baja y elevación de los marcadores bioquímicos de recambio óseo. Las fracturas preexistentes duplican, e incluso cuadruplican, el riesgo de padecer una fractura osteoporótica [Cummings, 1995].

**Tabla 3.**

<b>Factores de riesgo de fractura del fémur proximal</b>
Edad
Antecedentes maternos de fractura del fémur proximal
Pérdida de peso
Estatura alta a los 25 años
Mala salud
Hipertiroidismo previo
Uso de benzodiazepinas de acción prolongada
Uso de anticonvulsivantes
Consumo actual de cafeína (190mg/día)
Incapacidad para levantarse de una silla
Mala percepción de la profundidad (vista)
Mala sensibilidad al contraste (vista)
Frecuencia cardíaca >80 latidos por minuto
Fractura previa a partir de los 50 años
Caída lateral
Masa ósea baja
Índice de masa corporal bajo
Aumento de los marcadores de resorción ósea

Su prevalencia aumenta con la edad, y aunque muchos factores exógenos influyen en el riesgo de la osteoporosis (dieta, actividad física, fármacos y enfermedades coexistentes), uno de los más importantes factores de riesgo es la presencia de una historia familiar positiva. Por lo tanto, parece existir un componente genético de gran importancia en esta enfermedad.

#### **1.1.5. PREVENCIÓN:**

La detección y diagnóstico precoz de la población en riesgo es el mejor método para una adecuada intervención preventiva de la pérdida de masa ósea e intentar evitar las fracturas por fragilidad secundarias. La prevención es el mejor método para combatir la osteoporosis. En primer lugar, se trata de

conseguir alcanzar el máximo nivel de masa ósea de cada individuo y reducir su pérdida al mínimo a lo largo de la vida.

Para la obtención del máximo pico de masa ósea en cada persona, es necesaria una buena alimentación rica en calcio y vitamina D y una adecuada actividad física durante el periodo de crecimiento [Orwoll, 2001].

Para conseguir reducir la pérdida de masa ósea a lo largo de la vida, es necesario mantener una dieta equilibrada y rica en calcio y vitamina D, una actividad física adecuada y evitar los factores de riesgo asociados mediante la reducción del consumo de alcohol, tabaco y cafeína, la prevención de riesgo de caídas, evitar fármacos que reducen la masa ósea y llevar a cabo un buen control de las enfermedades concomitantes [Nguyen, 1998; Kiel, 1996; Simkin, 1987, Berard, 1997].

#### **1.1.6. TRATAMIENTO:**

Las medidas higiénico-dietéticas y farmacológicas dirigidas a adquisición y mantenimiento de masa ósea, se dirigen a los pacientes con presencia de fractura por fragilidad, osteoporosis o baja masa ósea, con factores de riesgo asociados, siempre según un criterio médico e individualizado para cada paciente.

- **Medidas higiénico-dietéticas:** individualizado según características personales, físicas y patología subyacente.

-**Actividad física:** se aconseja ejercicio aeróbico, mínimo de 30-60 minutos tres veces por semana.

-**Hábitos tóxicos:** se recomienda no consumo de alcohol ni tabaco. Reducción de consumo de sustancias como sedantes y tranquilizantes.

-**Hábitos dietéticos:**

- ***Cafeína:*** disminución de consumo. Más de 4 cafés al día (330mg cafeína) aumentan riesgo de fracturas.

-***Calcio:*** según la edad. En los adultos se aconseja consumo de 1200-1500mg/día. Si hay déficit dietético, debe establecerse un aporte de suplementos orales.

- *Vitamina D*: según la edad. Generalmente se recomienda un mínimo de 800 UI/día.

- **Tratamientos antirresortivos:**

Son tratamientos encaminados a enlentecer la pérdida de masa ósea. Entre ellos destacan la terapia hormonal sustitutiva (THS), los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), la calcitonina, los bifosfonatos, los análogos monoclonales que se unen al ligando RANKL y la vitamina D3.

- Los SERMS o THS están especialmente indicados para las mujeres posmenopáusicas con el objetivo de reducir la pérdida de masa ósea secundaria al déficit estrogénico.

- La calcitonina es una hormona sintetizada por la glándula tiroides que inhibe la actividad osteoclástica.

- La Vitamina D3 aumenta la absorción de calcio en el intestino, lo que favorece la mineralización ósea.

- Los bifosfonatos inhiben la resorción y, en consecuencia, aumentan la mineralización y la dureza del hueso y disminuyen el riesgo de padecer fractura por fragilidad.

- Los análogos monoclonales que se unen al ligando RANKL en la superficie de los osteoclastos inhiben su formación, actividad y supervivencia, con la consiguiente disminución de resorción ósea.

- **Tratamientos anabólicos u osteoformadores:**

La hormona paratiroidea (PTH) aumenta la formación ósea. Tiene un efecto dual; a concentraciones elevadas inhibe la formación ósea mientras que en pequeñas dosis y administrada de forma intermitente actúa como un fuerte agente anabólico.

Aparte de los descritos, actualmente de uso habitual, existen nuevos fármacos diana en el metabolismo óseo en una fase más inicial de investigación.



## 1.2. GENETICA DE LA OSTEOPOROSIS

La osteoporosis se incluye dentro de las enfermedades de etiología compleja o multifactorial. Se trata de enfermedades atribuidas a la interacción de varios factores genéticos con factores ambientales. No siguen, por consiguiente, un patrón de herencia mendeliano simple y su expresión fenotípica está, además, modulada por factores ambientales diversos y sus interacciones entre si. En el caso del riesgo de osteoporosis y de fracturas por fragilidad, tal como se ha comentado, la actividad física, el estilo de vida, la ingesta de calcio y vitamina D son factores ambientales que afectan a la DMO [Berard, 1997; Simkin, 1987; Kiel, 1996].

Durante esta última década, diversos estudios han constatado que la contribución genética de algunos factores de riesgo de la osteoporosis, tales como la DMO, marcadores de remodelado óseo y propiedades estructurales y de resistencia de la cadera, es muy intensa [Burge, 2007; Arden, 1996; Hunter, 2001; Kaprio, 1995; Nguyen, 2000; Snieder, 1998; Zintzara, 2011]. Esta evidencia de una contribución genética significativa también se ha descrito en la variación de la densidad observada en el pico masa ósea en los jóvenes como en la variación de la densidad en edades avanzadas [Styrkarsdottir, 2003].

Estas observaciones confirman que el riesgo de padecer osteoporosis depende de la suma de los factores genéticos y ambientales. Estudios aún más recientes intentan cuantificar el determinante de cada uno de ellos en el desarrollo de la osteoporosis. Parece que hasta un 60-90% de la variación de la DMO [Nguyen, 1998; Peacock, 2002] y un 37-62% de los parámetros geométricos del cuello femoral (FNGPs) [Demissie, 2007; Xiong, 2006; Zhao, 2010] se puede explicar por la contribución de los factores genéticos. La heredabilidad de la DMO depende del género, la etnia y las regiones esqueléticas. La DMO de columna, por ejemplo, tiene un componente genético mayor que la DMO de fémur [Nguyen, 2000].

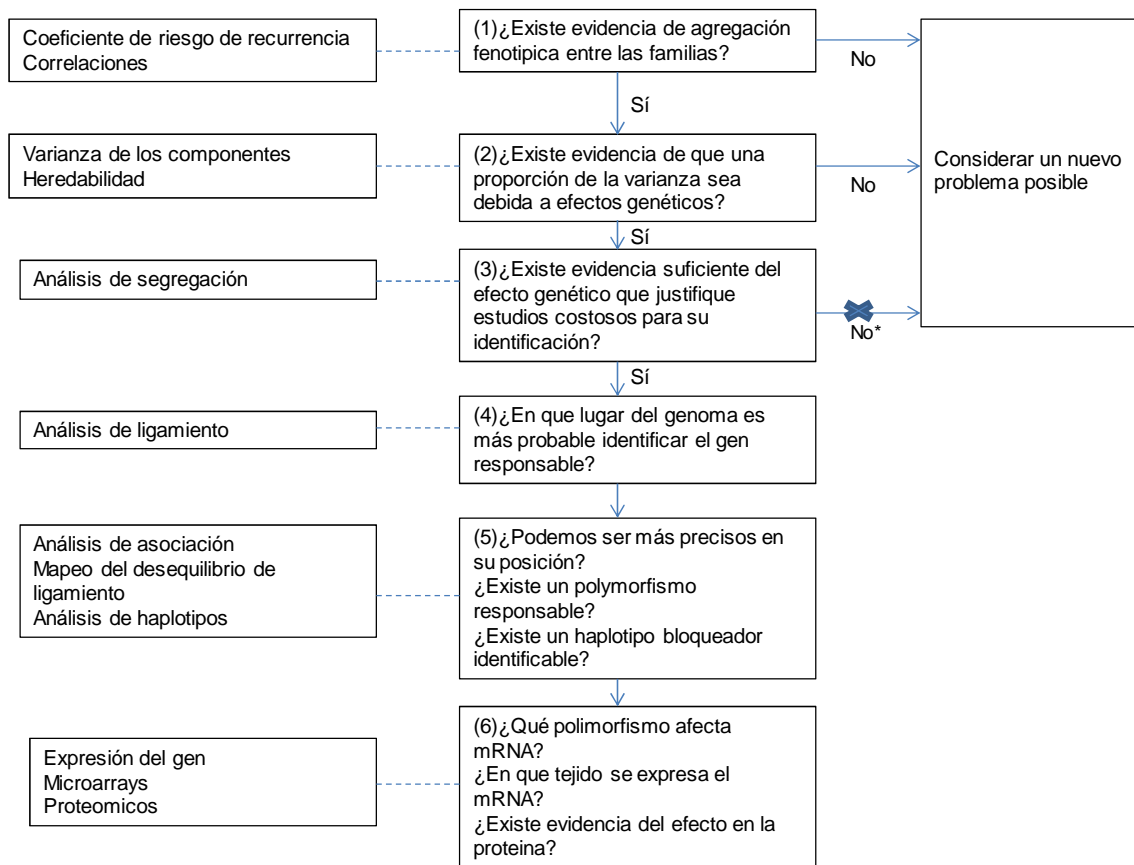
La evidencia de la contribución genética en la DMO y en los FNGPs ha conducido a realizar estudios genómicos de ligamiento [Ralston, 2010; Peacock, 2009; Xiao, 2006; Guo, 2010; Qureshi, 2001; Jiang, 2007; Moffet, 2005;

Rivadeneira, 2004; Zheng, 2012; Duncan, 2011] y de asociación [Richards, 2011; Xiong, 2006; Zhao, 2010; Zheng, 2012; Estrada, 2012] que han identificado diferentes *loci* responsables de estos fenotipos. Además se ha observado que la DMO y la fractura osteoporótica curiosamente comparten pocos componentes genéticos en común, lo que ha llevado a proponer que se trate de fenotipos determinados por conjuntos diferentes de genes [Huang, 2006].

### **1.2.1. ESTUDIO DEL COMPONENTE GENÉTICO**

La sistematización del estudio genético de una enfermedad compleja sugiere establecer el componente genético de dicha enfermedad, analizar la agregación familiar, estimar la heredabilidad y analizar la segregación. Una vez se dispone de estos datos se procede al genotipado de una serie de marcadores polimórficos considerados informativos y se realizan estudios de ligamiento y de asociación. Los estudios de ligamiento van encaminados a identificar regiones del genoma ligadas con un rasgo (*loci* responsables de la enfermedad), mientras que los de asociación buscan las asociaciones con un rasgo sobre un listado de regiones conocidos (tratan de encontrar la variante asociada a la enfermedad). Finalmente se requerirán estudios funcionales encaminados a validar los resultados que se han obtenido.

Figura 6. Planteamiento sistemático para la identificación y caracterización de los determinantes genéticos de las enfermedades complejas.



\* Debido a que el análisis de segregación no proporciona una evidencia significativa de los principales genes implicados en la enfermedad, sería ilógico seguir intentando identificar determinantes genéticos de la enfermedad en estudio.

*Adaptada de Burton, PR, Tobin MD, and Hopper, JL (2005). Key concepts in genetic epidemiology. Lancet. 366 (9489):941-51.*

La agregación familiar permite establecer si existe una frecuencia mayor de padecer un fenotipo concreto entre los parientes cercanos de un individuo afecto, en comparación con los parientes cercanos de un individuo no afecto [Burton, 2005]. Los estudios de agregación familiar indican que el riesgo recurrente para la osteoporosis es muy elevado en parientes de primer orden, pero que disminuye drásticamente en parientes lejanos [Brown, 2005]. El riesgo recurrente entre hermanos para padecer osteoporosis es de 2.6 [Feg, 2005].

Los estudios de análisis de los componentes de variación genética pueden incrementar su potencia estadística mediante la utilización de familias con genealogía extendida (tres o más generaciones) [Blangero, 1997].

La heredabilidad corresponde a la proporción de la varianza fenotípica total debida a los efectos genéticos y, entendida de una forma más restringida, sería la proporción de la varianza total debida sólo a los efectos genéticos aditivos. La heredabilidad oscila entre los valores 0 y 1. El valor 1 indicaría que toda la varianza es debida a los efectos genéticos. El valor de la heredabilidad es un valor relativo que depende de la edad en la que se calcula y de la población en la que se ha hecho el estudio. El cálculo de la heredabilidad se puede hacer, por ejemplo, a partir de estudios en gemelos monocigóticos o dicigóticos o en grupos con parentesco de primer grado (padres e hijos o parejas de hermanos).

La descomposición de las correlaciones fenotípicas ( $\rho_p$ ) en los componentes genéticos ( $\rho_g$ ) y ambientales ( $\rho_e$ ) es una herramienta potencialmente valiosa, porque puede revelar relaciones ocultas entre rasgos [Comuzzie, 1996]. La fórmula que vincula las correlaciones fenotípicas, genéticas y ambientales entre dos rasgos también tiene en cuenta la heredabilidad para cada característica:

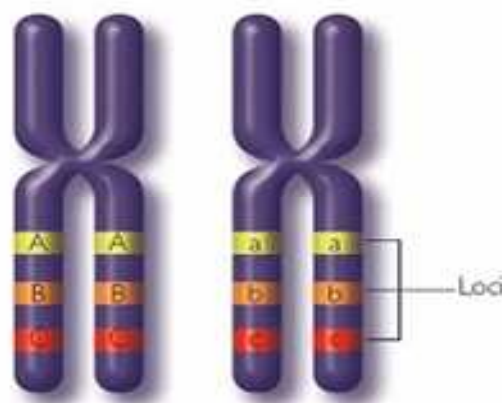
$$\rho_p = \sqrt{(h_1^2 + h_2^2)}\rho_g + \sqrt{(1-h_1^2)}\sqrt{(1-h_2^2)}\rho_e$$

### **1.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES CAUSANTES DE LA OSTEOPOROSIS Y ESTUDIOS FUNCIONALES:**

Las estrategias más utilizadas para la identificación y caracterización de genes implicados en la patogénesis de enfermedades complejas como la osteoporosis son los estudios de asociación y estudios de análisis de ligamiento. En todos los casos se busca evidencia de relación entre alguna característica fenotípica de la enfermedad y una serie de marcadores genéticos polimórficos.

Los estudios de ligamiento se realizan con la finalidad de identificar los *loci* donde se encuentran los genes implicados en la determinación de una enfermedad o fenotipo. Hay dos tipos de estudios de ligamiento: los paramétricos aplicados a enfermedades monogénicas y los no paramétricos aplicados en enfermedades complejas [Dawn Teare, 2005]. Los estudios de ligamiento dependen del uso de individuos emparentados.

Figura 7. *Loci/locus*: ubicación definida de un alelo dentro de un cromosoma.



<http://4.bp.blogspot.com>

Gracias a estudios de ligamiento a lo largo del genoma se han identificado diferentes *loci* ligados a fenotipos relacionados con la osteoporosis y algunos de estos se han identificado simultáneamente en estudio independientes [Devoto, 1998; Huang, 2006; Wilson, 2003].

Los estudios de asociación son los que buscan asociación de un determinado fenotipo o carácter y una serie de marcadores genéticos polimórficos. Los caracteres pueden ser cuantitativos (DMO) o cualitativos (presencia o ausencia de fractura osteoporótica). En función del muestreo de los individuos del estudio existen estudios de asociación familiar y estudios de asociación con poblaciones no emparentadas. La prueba de desequilibrio de transmisión (TDT: Transmission Disequilibrium Test) es el método más común para analizar la asociación familiar [Laird, 2006]. En este caso la muestra consta de diversos grupos de tres individuos formados por un hijo afecto y sus progenitores. El TDT compara estadísticamente el número de alelos transmitidos observados

con el número de alelos que se esperarían si se transmitieran por azar. Este test permite detectar asociación en presencia de ligamiento.

La selección del fenotipo que se analizará es un factor importante a la hora de diseñar el estudio de asociación. El fenotipo puede ser de tipo cuantitativo o cualitativo y esto marcará qué tipo de estudio estadístico se realizará posteriormente.

La mayoría de estudios de asociación realizados consisten en la selección de *tag* SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) o SNPs localizados en zonas funcionales de genes candidatos para la enfermedad [Agueda, 2008; Huang, 2009; Willer, 2008]. Hoy en día, para la detección de genes candidatos, también se pueden realizar estudios sin una hipótesis concreta llamados GWAS (estudios de asociación a gran escala). Las asociaciones significativas pueden ser debidas a que el polimorfismo sea el causante del fenotipo de la enfermedad (asociación directa) o que el polimorfismo que analizamos esté relacionado debido al desequilibrio de ligamiento con el causante de la enfermedad (asociación indirecta) [Cordell, 2005]. Por este motivo cuando se detecta una asociación entre polimorfismo y fenotipo es aconsejable demostrar la funcionalidad de este polimorfismo.

Figura 8. Un SNP común se puede definir como un *locus* donde están presentes dos alelos, con una frecuencia  $\leq$  al 1% o más. Podrían ser unos 10 millones por todo el genoma humano. [International HapMAP Consortium, 2003]

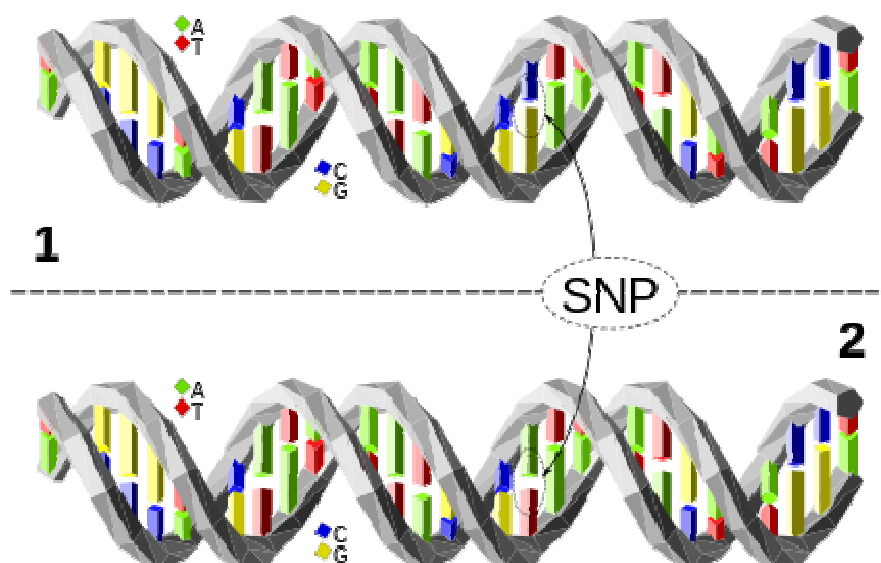
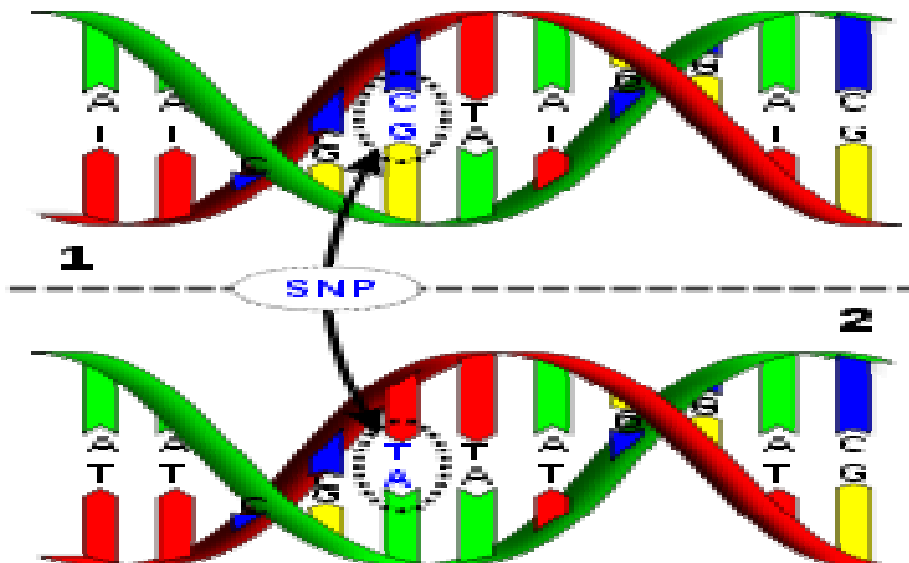


Figura 9. Single nucleotide polymorphism (SNP): Variante de ADN con una variación de una única base.



<http://blogdelaboratorio.com/tag/polimorfismos>

Estos estudios pueden dar resultados contradictorios. Esto generalmente se debe a la estratificación de la muestra o falta de potencia estadística, pero también puede deberse a contradicciones biológicas. Cabe recordar que las enfermedades multifactoriales tienen una etiología compleja que hace que la epistasis, las interacciones gen-ambiente, los diferentes patrones poblacionales y el fondo genético de cada cohorte pueda influir en el resultado final de dicha asociación.

Los estudios de asociación a gran escala (GWAS) son estudios realizados con cohortes en las que se genotipan cientos de miles de SNPs, con la finalidad de encontrar asociación entre variantes genéticas y fenotipos de la enfermedad que se estudia. Pero estos estudios no dan información sobre la funcionalidad de los polimorfismos asociados a la enfermedad o las relaciones

entre genes ni como pueden cambiar estas relaciones a lo largo del tiempo en diferentes ambientes o a lo largo de una enfermedad [Farber, 2009].

Los estudios funcionales sirven para la validación funcional de un polimorfismo o haplotipo asociado a un fenotipo (estudios de validación funcional de polimorfismo) y analizan la expresión de diversos genes o de las proteínas que codifican (estudios funcionales genómicos). La transcriptómica analiza la expresión de las proteínas y complementa la información de los estudios genómicos.

### **1.2.3. ESTUDIOS GENÉTICOS CON FENOTIPOS OSTEOPORÓTICOS:**

Existen diversos estudios en la literatura que analizan los fenotipos osteoporóticos a partir de análisis de familias.

Existe el consorcio Genetic Markers for Osteoporosis (GENOMOS) creado en el 2003 donde participan diferentes centros europeos para unir esfuerzos en la investigación de la osteoporosis.

Se han identificado diversos genes asociados a fenotipos osteoporóticos, tales como COL1A1, ESR1, VDR, PDE4D y TGF-Beta1, mediante estudios de tipo caso-control [Huang, 2006; Reneland, 2005]. Por ejemplo, el estudio realizado por Xiong et al. publicado en 2006, con datos de 405 familiares, analizó el efecto de diversos polimorfismos repartidos en 20 genes candidatos para la osteoporosis [Xiong, 2006] y se observó que polimorfismos situados en los genes *LRP5*, *CYP17*, *RANK*, *RANKL*, *BMP2*, *DBP* y *TNFR2* influenciaban en la DMO. En otro estudio de ligamiento para los parámetros geométricos realizado en 79 pedigríes, realizado por Shen et al. presentaron una posible influencia en la geometría del Cross-sectional del cuello femoral en 4 regiones genómicas (8q24, 10q26, 20p12-q12, cromosoma X)[Shen, 2005].

Algunos de los estudios importantes en interacciones genéticas han derivado del estudio Róterdam. Por ejemplo, Uitterlinden et al. describen, a partir del análisis de 1004 mujeres del estudio, que el haplotipo VDR y el polimorfismo COLIA1 Sp1 interaccionan en la regulación del riesgo de fractura. Concluyen que quienes los presentan están sujetas a un aumento de riesgo de fractura de 4.4 respecto al grupo de referencia [Uitterlinden, 2001]. En otro



análisis de la población de Róterdam a partir de 6363 sujetos, describen que los alelos ESR1, ESR2 y IGF-1 interactúan en la regulación de la susceptibilidad para la fractura osteoporótica y también con otros fenotipos, entre los que se incluye la DMO y algunos aspectos de la estructura del cuello femoral [Rivadeneira, 2006].

También se han publicado diversos estudios que muestran una asociación significativa entre diversos alelos y la DMO mediante análisis de GWAS. En el estudio GWAS de TwinsUK/Róterdam [Richards, 2008], se observó una probable asociación entre el gen TNFRSF11B (osteoprotegerina) y la DMO, osteoporosis, y la expresión de osteoprotegerina. Richards et al; también observaron una asociación entre el gen LRP5 (Proteína relacionada con el receptor de baja densidad de lipoproteína) con la disminución de la DMO y aumento del riesgo de fracturas osteoporóticas, independiente al efecto de la DMO. Un estudio de metanálisis [Rivadeneira, 2009] similar pero sin un extenso análisis, ha combinado el efecto de 20 alelos de riesgo para DMO descubiertos en GEFOS, en su muestra con fenotipos de DMO y fracturas (Rotterdam study).

Liu et al en el 2006 realizaron una revisión de los estudios funcionales genómicos más relevantes que se han realizado a partir de *microarrays* en relación con fenotipos óseos, publicados hasta final de diciembre del 2004. Aportando una revisión reciente de estudios genéticos relacionados con la osteoporosis, para poder utilizarlo y acomodarlo a nuevos futuros proyectos de investigación en esta área.

En resumen, existe una evidencia fuerte de la asociación genética de diversos parámetros densitométricos y de geometría ósea en múltiples estudios de ligamiento, GWAS y asociación genómica descritos en la literatura en la última década. Esta evidencia científica nos manifiesta la importancia de intentar potenciar estudios futuros genéticos en esta enfermedad compleja para entender mejor la fisiopatología relacionada con el riesgo de fracturas por fragilidad y el desarrollo de osteoporosis.

## **2. HIPÓTESIS:**

### **2.1. HIPÓTESIS GENERAL:**

- La interacción de diversos factores epidemiológicos y genéticos condiciona la aparición de osteoporosis, enfermedad caracterizada por un incremento de la fragilidad ósea y riesgo de fractura.
- Los análisis multivariados en familias con genealogía extendida aumentan el poder estadístico para identificar los factores responsables del incremento del riesgo de fractura.

### **2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICA:**

- Existe una contribución genética significativa en los fenotipos de densidad mineral ósea en nuestra población de familias con genealogía extendida reclutadas a partir de un propósitos con osteoporosis.
- Existe una contribución genética significativa en los parámetros geométricos estructurales y de resistencia ósea del cuello femoral en nuestra población de familias con genealogía extendida reclutadas a partir de un propósitos con osteoporosis.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. OBJETIVOS GENERALES:**

- Describir los parámetros epidemiológicos, la heredabilidad y correlación genética de diversos fenotipos osteoporóticos en una población obtenida a partir de familias con genealogía extendida.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar si existe heredabilidad y analizar las correlaciones genéticas entre seis fenotipos densitométricos y cuatro fenotipos clínicos relevantes de afectación ósea y presencia de fracturas.
- Determinar si existe heredabilidad y analizar las correlaciones genéticas entre 17 fenotipos estructurales y de resistencia de cadera a través del programa HSA y tres fenotipos clínicos relevantes de afectación ósea.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS:

-Reclutamiento de la muestra:

El proyecto GAO incluye 11 familias españolas con genealogía extendida. Las familias constan de al menos diez individuos vivos distribuidos en tres o más generaciones. La ventaja de las grandes genealogías es, a igualdad de individuos analizados, las grandes genealogías ofrecen más poder estadístico que las muestras individuales o de familias más pequeñas [Blangero, 1997]. Concretamente, a través de la simulación *post-hoc*, el análisis de poder de nuestra muestra demostró ser  $> 0.8$  para los parámetros con una heredabilidad  $> 0.37$ , asumiendo un logaritmo of the odds score (LOD)=2, y una heredabilidad  $> 0.44$  asumiendo un LOD=3. Por ello obtuvimos resultados representativos para la mayoría de los parámetros cuantitativos estudiados.

Todas las familias fueron seleccionadas a través de un individuo afectado de osteoporosis (*propositus*). Se utilizó la siguiente definición de osteoporosis: DMO de cuello femoral, cadera total o columna con una puntuación T-score  $\leq -2.5$  o la existencia de al menos una fractura no traumática en sujetos mayores 21 años de edad. Todos los *propositus* de las 11 familias cumplían el criterio de T-score  $\leq -2.5$ , aunque sólo dos presentaban esta puntuación en todas las localizaciones de DMO. Tres de los 11 *propositus* presentaban múltiples fracturas osteoporóticas.

Se realizó una entrevista médica a todos los participantes que tuvieron que responder a las preguntas de un amplio cuestionario clínico-epidemiológico relacionado con datos considerados relevantes en el desarrollo de osteoporosis: historia clínica de reproducción, edad de menarquia y menopausia, toma de fármacos que influyen en riesgo de desarrollar osteoporosis, hábito tabáquico y enólico, consumo de café, ingesta de calcio en la dieta, exposición solar y actividad física. También se registraron los antecedentes de fracturas óseas previas tanto traumáticas como no traumáticas y las comorbilidades potenciales como cardiopatías y diabetes. En el Anexo 1 se encuentran las definiciones de las variables registradas y en el Anexo 2 el cuestionario de actividad física.

El Comité Ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona revisó y aprobó el protocolo del estudio GAO (Anexo 3). Todos los participantes adultos firmaron un consentimiento informado. También lo hicieron los responsables de los participantes menores. En todo momento, el estudio se ciñó a las directivas de la Declaración de Helsinki (Anexo 4).

- Muestra sanguínea y extracción de ADN:

Se obtuvo una muestra de 35 ml de sangre venosa periférica de los participantes, que se distribuyó en tres tubos: de citrato para extracción de ADN, de ARN PAXgene® (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Suiza) para el almacenamiento y posterior análisis de ARN y heparinizado para futuros análisis sanguíneos.

Se realizó la extracción del ADN de las células sanguíneas con un procedimiento estándar de desplazamiento [Miller, 1988] después de separar y almacenar el plasma para futuros ensayos bioquímicos.

- Densitometría ósea:

Un técnico experto realizó una densitometría de la columna vertebral, fémur y cuerpo entero a todos los participantes utilizando un sistema de Discovery DXA con el software v2.3 APEX (Hologic, Bedford, MA, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Dos participantes fueron excluidos del análisis densitométrico. Uno por fracturas y otro debido a cirugía de reemplazo total de cadera bilateral. Para el análisis de resistencia y propiedades geométricas de la cadera, se utilizó el software de análisis estructural de la cadera (HSA: *hip structural analysis*) incluido en APEX. Las exploraciones se realizaron y se revisaron por el mismo técnico y un médico respectivamente, ambos de ellos con certificado de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica.

En nuestro estudio se incluyeron 23 fenotipos densitométricos considerados de gran relevancia clínica. Los fenotipos incluidos fueron la densidad mineral ósea ( $\text{g/cm}^2$ ) de la cadera total, área del trocánter, zona intertrocantérea, cuello femoral, columna vertebral y cuerpo entero (excluida la

cabeza); propiedades geométricas tales como la longitud del eje de la cadera (mm) y el cuello femoral - ángulo del eje del cuello femoral (grados); y varias medidas de resistencia ósea, como la media de grosor cortical (ACT; cm), tasa de pandeo (BR;  $\text{cm}^3$ ), área de la sección transversal (CSA;  $\text{cm}^2$ ), momento de inercia de la sección transversal (CSMI;  $\text{cm}^4$ ) y módulo de la sección (Z;  $\text{cm}^3$ ) del eje femoral, del cuello femoral y zona intertrocanterea. Esta serie de medidas con su definición y acrónimos puede verse en el Anexo 5: Hip Structural Analysis.

- Definición de las categorías fenotípicas:

A parte de los 23 parámetros cuantitativos relacionados con la osteoporosis, se estudiaron cuatro categorías fenotípicas con especial interés clínico:

1. Fenotipo "Affected1": corresponde a baja masa ósea según la definición más común de osteoporosis. Incluye a las personas > 21 años de edad que presentan una o más de las siguientes características:

- T-score  $\leq$  -2.5 (columna, cuello femoral o cadera total);
- al menos una fractura no traumática;
- tratamiento con bisfosfonatos en la actualidad.

2. Fenotipo "Affected2": corresponde a los pacientes que han sufrido al menos una fractura osteoporótica.

3. Fenotipo "Affected3": corresponde a un espectro más amplio de condiciones óseas. Incluye la presencia de una baja masa ósea definida como osteoporosis (Affected1) más individuos con osteopenia, definida ésta por personas > 21 años de edad que presenta:

- T-score  $\leq$  -1 (columna, cuello femoral o cadera total).

4. Fenotipo "Affected4": es una extensión de "Affected1", con inclusión de los individuos <21 años de edad que presentan una o más de las siguientes características:

- Z-score  $\leq$  -2.5 (columna, cuello femoral o cadera total);
- al menos una fractura no traumática;
- en tratamiento con bisfosfonatos actualmente.

Sólo cuatro participantes menores de 21 años fueron clasificados en Affected4, por lo que la diferencia de individuos entre los Affected1 y Affected4 tan solo eran de cuatro individuos. Se observó que no había diferencias significativas entre los valores de T-score y Z-score entre las personas entre 20 y 50 años de edad en nuestra muestra.

- Estudio de microsatélites y validación del *pedigree*:

Como marcadores, se utilizaron 13 microsatélites autosómicos seleccionados por su relevancia epidemiológica basada en estudios previos. Concretamente, los 13 mostraban un LOD score elevado (normalmente  $>3$ ) para parámetros cuantitativos relacionados con la osteoporosis

Por cada microsatélite se realizó una amplificación por PCR mediante plantillas de ADN según el método estándar (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU). Se realizó el análisis de PCR con el Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer utilizando GeneScan™ 500 LIZ™ como estándar de tamaño (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Los genotipos se determinaron utilizando el software v3.7™ GeneMapper® ABI Prism (Applied Biosystems).

Una vez completado el genotipado, se realizó la verificación de las 11 genealogías en busca de incoherencias mendelianas con FBAT v2.0.3 [17: Laird'00]. La mayoría de las inconsistencias se abordaron utilizando el re-genotipado con los mismos microsatélites. Sin embargo, en dos casos se descubrieron inconsistencias en más de un marcador de microsatélite, que requirió la exclusión de nueve participantes. El tamaño de muestra final fue de 367 individuos.

- Análisis de ligamiento:

Se analizó la muestra mediante la replicación de señales de ligamiento descritos en la literatura con anterioridad y con el potencial de analizar nuevas señales de ligamiento.

Para este fin, se realizaron análisis de varianza entre dos puntos (es decir, un rasgo - un locus) de componentes de ligamiento entre rasgos y marcadores de microsatélites mediante un procedimiento estándar incluido en el software v4.3.1 SOLAR [Blangero, 1997].

El análisis de ligamiento presupone la especificación de la covarianza genética esperada entre parientes arbitrarios como una función de las relaciones de identidad por descendencia (IBD) en un locus marcado previamente. Lo primero que calcula son las frecuencias alelo marcador con un método de máxima verosimilitud y luego se infiere la matriz de la IBD para cada marcador en nuestra genealogía compleja con el método Harkov cadena Monte Carlo. Ambos métodos están incluidos en SOLAR. Para los dos marcadores, el umbral de detección para establecer una vinculación/ligamiento se considera  $\approx 3$ . Es decir, un valor igual o superior rechaza la hipótesis nula de no vinculación.

Para el análisis de la replicación, se realizó el análisis de dos puntos de ligamiento entre cada uno de los tres fenotipos densitométricos que se midieron en nuestra muestra (DMO del cuello femoral, de columna vertebral y trocantérea) y el microsatélite correspondiente. Esto implica un número total de 11 análisis.

Para el descubrimiento de nuevas señales de ligamiento, se realizó un análisis de ligamiento entre cada uno de los 27 fenotipos (23 parámetros cuantitativos y cuatro fenotipos de estado) y cada uno de los 13 microsatélites. En este caso, el número total de tests fue de  $27 \times 13 = 351$ . Las covariables incluidas fueron la edad,  $edad^2$  (que refleja un efecto no lineal de la edad), sexo, índice de masa corporal, edad de menopausia para las mujeres postmenopáusicas y el consumo de alcohol, así como las interacciones de edad y  $edad^2$  con el sexo. Estas covariables fueron seleccionadas de un conjunto mayor de covariables en función de haber demostrado un efecto independiente estadísticamente significativo en un análisis preliminar.

- Genotipado de SNPs y mapeo:



Se desarrolló un análisis de asociación basado en familias para la identificación de diversos polimorfismos de cambio puntual de nucleótido (SNPs) independientes en las regiones genómicas que habían mostrado vinculación con algún rasgo de interés (es decir, que no estaban en desequilibrio de ligamiento entre ellos según los datos de la base de HapMap). Los SNPs se genotiparon por PCR en tiempo real, utilizando un ensayo estándar de genotipificación TaqMan SNP genotyping según protocolo de Applied Biosystems. Las mediciones de intensidad de fluorescencia del producto de reacción final y la recolección de datos se llevaron a cabo en un Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System.

Las pruebas de asociación de SNPs con un fenotipo se realizó con el procedimiento QFAM, una prueba desarrollado para el estudio de familias e implementado en PLINK v1.07 [Purcell, 2007]. QFAM utiliza permutaciones para tener en cuenta la dependencia entre individuos relacionados, adoptando el modelo intra/inter tal como es utilizado por otros [Fulker, 1999; Abecasis, 2000]. Sin embargo, en lugar de ajustar el modelo de un máximo de probabilidad de componentes de la varianza, como lo realiza el QTDT, QFAM primero realiza una regresión lineal simple del fenotipo en el genotipo y luego utiliza un procedimiento especial de permutación para corregir la estructura de la familia.

## 5. RESULTADOS:

### 5. 1. ARTICULO I:

#### **Heritability of bone mineral density in a multivariate family-based study.**

Hernandez-de Sosa N, Athanasiadis G, Malouf J, Laiz A, Marin A, Herrera S, Farrerons J, Soria JM, Casademont J. *Calcif Tissue Int.* 2014; 94(6):590-6. Factor Impacto: 3.372.

#### **RESUMEN:**

Existe evidencia de la contribución genética de la Densidad Mineral Ósea (DMO) y, mediante estudios de ligamiento y de asociación de genoma, se ha identificado a diferentes *loci* que la afectan. En el presente trabajo, se estudia, concretamente, la heredabilidad y las correlaciones de seis fenotipos de densitometría ósea y cuatro fenotipos de masa/fractura. Para este fin, desarrollamos un estudio basado en familias con genética de la osteoporosis al que llamamos proyecto GAO por “Análisis Genético de la Osteoporosis”. El objetivo principal de nuestra investigación fue examinar la contribución de los factores genéticos y ambientales en la determinación de los fenotipos relacionados con la osteoporosis. El Proyecto estudió 11 familias extensas de España. Todas las familias fueron seleccionadas a través de un individuo afecto de osteoporosis. La DMO se midió mediante absorciometría dual de rayos X. La proporción de varianza de DMO atribuible a las covariables significativas osciló entre el 25% (para la DMO del cuello femoral) y el 48% (para la DMO de cuerpo total). La gran mayoría de los fenotipos densitométricos mostraron heredabilidad altamente significativa, que oscilaron entre 0.252 (DMO de cuerpo total) y 0.537 (DMO del trocánter) después de corregirse por los efectos de covarianza. Todos los fenotipos de densitometría mostraron correlaciones genéticas altas y significativas (-0,772 a -1,000) con el estado de baja masa ósea/condición osteoporótica (Affected3). Nuestros resultados proporcionan evidencia adicional sobre la heredabilidad y ayudan a establecer en qué medida la contribución genética influye entre la DMO y los fenotipos masa ósea/fractura en una población española. Con ello se refuerza la importancia de la detección de factores de riesgo genéticos, así como el

conseguir un diagnóstico precoz para desarrollar las mejores estrategias terapéuticas y preventivas.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00223-014-9852-9>



















## 5.2. ARTICULO II:

**Genetic contribution of Femoral Neck Bone Geometry to the risk of developing Osteoporosis. A Family-Based Study.** Hernandez-de Sosa N, Athanasiadis G, Malouf J, Laiz A, Marin A, Herrera S, Farrerons J, Soria JM, Casademont J. *PLoS ONE*. 2016. Vol 11(5): e0154833. Factor impacto: 3.234

### RESUMEN:

Estudios preliminares han sugerido que los parámetros geométricos del cuello femoral pueden ser factores independientes de la DMO para la de predicción de riesgo de fractura femoral osteoporótica. En este estudio analizamos el papel de los factores genéticos y ambientales en las propiedades geométricas femorales medidas en una muestra de familias españolas con genealogía extendida y con presencia de fracturas por osteoporosis. Volvimos a utilizar la cohorte del “Análisis Genético de la Osteoporosis” (GAO) con participación de 11 familias con un número total de 376 individuos. Se estudiaron tres categorías fenotípicas con particular interés clínico. Llevamos a cabo un análisis estructural de la cadera sobre la base de DXA mediante la determinación de 17 resistencias y fenotipos geométricos. Todas las propiedades femorales presentaron una heredabilidad altamente significativa, desde 0,252 hasta 0,586. Los factores genéticos mostraron correlaciones más significativas que los factores ambientales. El estado fenotípico de fractura osteoporótica (Affected2) y, sobre todo, el estado que combina una baja masa ósea y criterios de osteoporosis (Affected3) tuvieron el mayor número de correlaciones genéticas significativas con diversas propiedades femorales. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el uso de un método relativamente simple y fácil basado en una exploración densitométrica puede proporcionar datos útiles sobre las propiedades geométricas de la cadera en la práctica clínica. Además, nuestros resultados proporcionan una fuerte motivación para estudios adicionales con la finalidad de mejorar la comprensión

de la arquitectura y el mecanismo fisiopatológico y la genética de la osteoporosis.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862643/pdf/pone.0154833.pdf>



















## 6. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

En este estudio prospectivo se ha utilizado a los miembros de 11 familias de genealogía extendida con historia familiar de osteoporosis, con el objetivo de examinar la contribución genética y los factores ambientales en fenotipos relacionados con la osteoporosis.

Se ha realizado análisis de 23 parámetros cuantitativos y cuatro fenotipos con manifestaciones clínicas secundarios a la osteoporosis (afectos), todos ellos con alta relevancia asistencial.

De todas las covariables inicialmente introducidas en nuestro modelo, se ha observado una relación estadísticamente significativa con el sexo femenino, edad, IMC y edad de menopausia con los parámetros cuantitativos estudiados (DMO y la mayoría de parámetros geométricos). Se ha obtenido, mediante el análisis de la varianza, un rango de estimación que oscila entre 0.25 a 0.48 de la contribución de estas covariables a la DMO. Estos resultados reproducen los obtenidos previamente en la literatura [Ralston, 2010; Duncan, 2003; Naganathan, 2002; Orwoll, 2001; Kammeres, 2003; Karasik, 2010; Yang, 2006; Mitchell, 2003; Videman, 2007] excepto para la correlación entre la edad y la DMO que fue, sorprendentemente, positiva. Este hallazgo, aunque llamativo, puede explicarse por diversas razones. La primera, es que un tercio de nuestra muestra correspondía a menores de 30 años (antes de alcanzar el pico de masa ósea) y, como es conocido, en niños el registro de la proyección densitométrica del área de la columna puede ser menor a la realidad ósea. La segunda, es que el 10% de la muestra era de pacientes mayores de 70 años en los que los cambios degenerativos de la columna vertebral pueden interferir en la sobreestimación de la DMO.

La regresión lineal más importante observada relaciona las propiedades geométricas con el sexo del individuo, con el signo del coeficiente negativo. Ello confirma que ser mujer contribuye negativamente al CT, CSA, CSMI y Z. Sin embargo, como era de esperar, el BR ha tenido un coeficiente positivo, aunque sin llegar a la significación estadística.

El IMC se ha comportado contrariamente al género femenino, con un efecto significativo y positivo sobre la DMO y las propiedades geométricas,

pero negativo con BR. Los fenotipos afectos están influenciados de forma negativa pero significativa por la edad y de forma positiva por el IMC. Estos resultados concuerdan con otros estudios previos [Mitchell, 2003]. Esta relación no se ha observado en el grupo Affected2 (fractura osteoporótica). Una posible explicación de este resultado podría ser el tamaño de la muestra y otra, la poca homogeneidad de la edad de los pacientes con fracturas.

El análisis de ligamiento ha detectado señales fuertes y significativas con el parámetro de momento de inercia de la sección transversal de la diáfisis femoral; en la región cromosómica 17q21-23 (marcado por D17S787; LOD= 3.18), dos SNPs de COL1A1 (rs1800012 y rs1107946) y cuatro SNPs de SOST (rs10534024, rs9902563, rs1513670 y rs4792909). El gen COL1A1 codifica la alfa-1 de la cadena de colágeno y el SOST la esclerostina. Estas señales están vinculadas con el fenotipo de resistencia ósea [Athanasiadis, 2014].

La heredabilidad estimada de los fenotipos densitométricos, geométricos y de los fenotipos afectos ha sido claramente significativa. Con todo, nuestras heredabilidades estimadas han sido generalmente más bajas que las publicadas previamente [Arden, 1996; Park, 2012]. Otra vez, esto podría ser explicado por la aproximación basada en la utilización de familias extendidas y por la utilización de niños en nuestra muestra.

Las mayores heredabilidades estimadas se han obtenido en los fenotipos afectos (50-82%). Otros resultados destacables han sido la heredabilidad del 63% en la DMO del cuello femoral, un 61% en la columna vertebral y un 58% en el BR del cuello femoral.

El estudio GAO uno de los estudios familiares más extensos realizados en España que examina la correlación genética entre diferentes sitios de DMO, propiedades geométricas y estados fenotípicos. Hemos observado una fuerte y significativa correlación genética entre las diversas localizaciones de DMO y estados afectos, especialmente en el Affected3 (baja masa ósea/osteopénicos). Podemos resaltar que la contribución genética de la mayoría de parámetros geométricos del cuello femoral ha sido mayor que la contribución ambiental, sobre todo y particularmente en el fenotipo Affected3. Los individuos pertenecientes a este fenotipo representan el espectro de pacientes con baja masa ósea, incluyendo los pacientes osteoporóticos (Affected1) junto pacientes con T-score < -1 en la columna, cuello femoral o fémur total. Este es el grupo

estudiado con mayor número de individuos (n = 213).

El BR se correlaciona positivamente con el estado afecto, de forma que cuanto mayor es el BR, mayor es el riesgo de fractura por fragilidad, hecho ya descrito en la literatura [Xiong, 2006; Piters, 2012; Duan, 2003]. Al contrario, los demás parámetros se correlacionan negativamente. Si observamos los demás estados afectos, la tendencia de las correlaciones es similar pero menor, quizá por encontrarnos con menor potencia para su detección debido al menor número de pacientes incluidos en estos grupos (Affected1 n = 66 y Affected2 n = 24).

La correlación genética más baja encontrada entre los parámetros densitométricos fue con la presencia de fractura (Affected2). Esto probablemente refleja que las fracturas dependen menos del factor genético que de los ambientales, como también está reflejado en diversos estudios [Richards, 2012; Deng, 2006]. Pero estos resultados también pueden estar sesgados por la pequeña muestra analizada de este grupo de pacientes. Podríamos concluir que la contribución genética de la DMO de la variante baja masa ósea no parece responsable en la influencia del riesgo de fractura.

Por otro lado, entre los parámetros geométricos destacamos que CT, CSA y CSMI están relacionados con la resistencia de compresión axial ósea y la rigidez estructural. La asociación de los valores bajos de estos parámetros con el alto riesgo de fractura de cadera ya ha sido descrita previamente en la literatura [Zhang, 2011; Aalborg, 2005]. Estudios de GWAS previos han puesto de manifiesto diversas asociaciones entre propiedades CT, CSA, CSMI e incluso BR, y parámetros genéticos [Piters, 2012; Stykardosttir, 2008; Xiong, 2006; Duan, 2003; Guo, 2010]. Por lo tanto, puede ser interesante la utilización de nuestros datos para futuros estudios de GWAS.

La contribución de los factores ambientales fue menor que la contribución genética tanto para los parámetros densitométricos como para las propiedades geométricas. Ello nos permite concluir que los factores ambientales presentan menor influencia que los factores genéticos en los estados relacionados con fragilidad ósea.

En consecuencia, es necesario la investigación de otros *locis* genéticos que puedan influenciar en el riesgo de fractura osteoporótica independientes a



los *locis* implicados en la DMO y las propiedades geométricas [Deng, 2006; Medina-Gomez, 2012].

Una de las ventajas de nuestro estudio es el diseño basado en el análisis de genealogía extendida, que estima mejor las influencias genéticas que otro tipo de estudios. Por ejemplo, los estudios en gemelos tienden a sobreestimar la contribución genética de los fenotipos debido a que los factores ambientales son más próximos entre los gemelos que entre parejas no gemelares [Slemenda, 1991; Tse, 2009]. Al mismo tiempo, la inclusión de muchos miembros de la misma familia hace la separación de los efectos genéticos y ambientales más interesante [Naganathan, 2002].

Pero nuestro estudio, inevitablemente, no está libre de limitaciones, la más importante de las cuales ha sido la presencia de un número pequeño de individuos con fracturas por fragilidad (Affected2). Estos pacientes, sin duda proporcionan la información más relevante para comprender mejor los factores responsables o contribuyentes en las fracturas osteoporóticas. Pero creemos que es legítimo asumir que los Affected3 (baja masa ósea) y los Affected1 (osteoporóticos) incluyen al paciente en riesgo de desarrollar fracturas y así, asumirlos como etapas cruciales previas al Affected2.

## **6.1. RELEVANCIA:**

La utilización de un método relativamente simple y sencillo basado en estudio DXA puede facilitar resultados útiles de parámetros densitométricos, de FNGPs para la práctica clínica y para la investigación.

La importante influencia genética observada entre la DMO, las propiedades geométricas y los fenotipos afectados estudiados, nos proporcionan una gran motivación para intentar estrategias de estudios genéticos basados en ligamiento y análisis de asociación genómica (GWAS) para intentar comprender mejor el mecanismo fisiológico-patológico de la arquitectura ósea y la genética de la osteoporosis.

La consecuencia última es contribuir a desarrollar nuevas estrategias para una detección precoz de los factores de riesgo y optimizar el diagnóstico

precoz y las medidas preventivas y terapéuticas sobre los factores etiológicos involucrados en el desarrollo de la osteoporosis. En definitiva, favorecer la implementación de un programa de mayor coste-efectividad, con el objetivo final de disminuir la morbimortalidad secundaria a las fracturas por fragilidad.

## 7. CONCLUSIONES:

- Se ha identificado una heredabilidad significativa de los parámetros densitométricos del cuello femoral y columna vertebral y de las propiedades de resistencia ósea.
- Se ha observado una fuerte y significativa correlación genética entre las diversas localizaciones de DMO y los estados afectos, especialmente en el estado fenotípico de baja masa ósea/osteopenia.
- Se ha observado una correlación genética mayor entre los parámetros geométricos y de resistencia de la cadera que con los parámetros ambientales.
- Se ha observado una fuerte y significativa correlación genética entre los parámetros geométricos y resistencia ósea de la cadera con el estado fenotípico de baja masa ósea/osteopenia.
- Estos resultados sugieren la existencia de una base genética común para los diferentes fenotipos estudiados e indican que probablemente haya genes que influyen en más de un fenotipo osteoporótico y variantes genéticas implicadas en diferentes mecanismos patogénicos.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO. A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66:279-292.

Agueda L, Bustamante M, Jurado S et al. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(12):1954-63.

Ahlborg HG, Nguyen ND, Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Contribution of hip strength indices to hip fracture risk in elderly men and women. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(10):1820-7.

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

Anonymous. Physicians Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *NOF, Washington, DC, USA.* 1998; pp 1-38.

Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res.* 1996;11(4):530-534.

Athanasiadis G, Malouf J, Hernandez-Sosa N, Martin-Fernandez L, Catalan M, Casademont J, Soria JM. Linkage and association analyses using families identified a locus affecting an osteoporosis-related trait. *Bone.* 2014; 60: 98-103

Blangero J, Almasy L. Multipoint oligogenic linkage analysis of quantitative traits. *Genet Epidemiol.* 1997;14(6):959-964.

Blangero J, Williams JT, Almasy L. Novel family-based approaches to genetic risk in thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1391-1397.

Beck TJ, Looker AC, Mourtada F, Daphtary MM, Ruff CB. Age trends in femur stresses from a simulated fall on the hip among men and women: evidence of homeostatic adaptation underlying the decline in hip BMD. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(9):1425-32.

Berard A, Bravo G, Gauthier P. Meta-analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 1997; 7(4):331-337.

Brown, MA. Genetic studies of osteoporosis—a rethink required. *Calcif Tissue Int.* 2005; 76(5):319-25.

Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(3):465-475

Burton, PR, Tobin MD, and Hopper, JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005; 366 (9489):941-51.

Crabtree NJ, Kroger H, Martin A, et al. Improving risk assessment: hip geometry, bone mineral distribution and bone strength in hip fracture cases and controls. The EPOS study. *Osteoporos. Int.* 2002; 13:48-54.

Duncan EL, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* 2011; 7(4):e1001372.

Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res.*1992; 7(2):221-7.

Cordell HJ and Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet.* 2005; 366 (9491):1121-31.

Cummings SR, Black D. Bone mass measurements and risk of fracture in Caucasian women: a review of findings from prospective studies. *Am J Med.* 1995; 98(2A):24S-28S.

Danielson ME, Beck TJ, Karlamangla AS, Greendale GA, Atkinson EJ, Lian Y, Khaled AS, Keaveny TM, Kopperdahl D, Ruppert K, Greenspan S, Vuga M, Cauley JA. A comparison of DXA and CT based methods for estimating the strength of the femoral neck in post-menopausal women. *Osteoporos Int.* 2013; 24(4):1379-88.

Dawn Teare, M and Barrett, JH. Genetic linkage studies. *Lancet.* 2005; 366(9491):1121-31.

Demissie S, Dupuis J, Cupples LA, Beck TJ, Kiel DP, Karasik D. Proximal hip geometry is linked to several chromosomal regions: genome-wide linkage results from the Framingham Osteoporosis Study. *Bone.* 2007; 40(3):743-50.

Deng HW, Shen H, Xu FH, et al. Several genomic regions potentially containing QTLs for bone size variation were identified in a whole-genome linkage scan. *Am. J. Med. Genet.* 2003; 119: 121-131.

Deng FY, Lei SF, Li MX, Jiang C, Dvornyk V, Deng HW. Genetic determination and correlation of body mass index and bone mineral density at the spine and hip in Chinese Han ethnicity. *Osteoporos Int.* 2006; 17(1):119-124.

Devoto, M, Shimoya K, Caminis J et al. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur J Hum Genet.* 1998; 6(2):151-7.

Duan Y, Beck TJ, Wang XF, Seeman E. Structural and biomechanical basis of sexual dimorphism in femoral neck fragility has its origins in growth and aging. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(10):1766-74.

Estrada K, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012; 44(5):491-501.

Farber, CR and Lusi AJ. Future of osteoporosis genetics: enhancing genome-wide association studies. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(12):1937-42.

Faulkner KG, Wacker WK, Barden HS, Simonelli C, Burke PK, Ragi S, Del Rio L. Femur strength index predicts hip fracture independent of bone density and hip axis length. *Osteoporos Int.* 2006; 17: 593–599.

Feng Y, Hsu, YH, Terwedow H et al. Familial aggregation of bone mineral density and bone mineral content in a Chinese population. *Osteoporosis Int.* 2005; 16 (12):1917-23

Fulker DW, Cherny SS, Sham PC, et al. Combined linkage and association sib-pair analysis for quantitative traits. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:259-267.

Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Gluer CC, Grampp S, Harris ST, Jergas M, Lang T, Lu Y, Majumdar S, Mathur A, Takada M. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:707–730.

Greenspan SL, Myers ER, Maitland LA, Resnick NM, Hayes WC. Fall severity and bone mineral density as risk factors for hip fracture in ambulatory elderly. *JAMA.* 1994; 271(2):128-33.

Guo Y, Tan LJ, Lei SF, Yang TL, Chen XD, Zhang F, Chen Y, Pan F, Yan H, Liu X, Tian Q, Zhang ZX, Zhou Q, Qiu C, Dong SS, Xu XH, Guo YF, Zhu XZ, Liu SL, Wang XL, Li X, Luo Y, Zhang LS, Li M, Wang JT, Wen T, Drees B, Hamilton J, Papasian CJ, Recker RR, Song XP, Cheng J, Deng HW. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet.* 2010; 6(1):e1000806.

Hamdy RC, Petak SM, Lenchik L International Society for Clinical Densitometry Position Development Panel and Scientific Advisory Committee. Which central dual X-ray absorptiometry skeletal sites and regions of interest should be used to determine the diagnosis of osteoporosis? *J Clin Densitom.* 2002; 5 Suppl:S11-8.

Huang, QY and Kung, AW. Genetics of osteoporosis. *Mol Genet Metab.* 2006; 88(4):295-306.

Huang QY, Li GH and Kung AW. Multiple osteoporosis susceptibility genes on chromosome 1p36 in Chinese. *Bone*. 2009; 44(5):984-8.

Hunter DJ, de Lange M, Andrew T, Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic variation in bone mineral density and calcaneal ultrasound: a study of the influence of menopause using female twins. *Osteoporos Int*. 2001;12(5):406-411.

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003; 426:489-96.

Janssens, K. and Van Hul, W. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet*. 2002;11(20): 2385-93.

Jiang H, Lei SF, Xiao SM, Chen Y, Sun X, Yang F, Li LM, Wu S, Deng HW. Association and linkage analysis of COL1A1 and AHSG gene polymorphisms with femoral neck bone geometric parameters in both Caucasian and Chinese nuclear families. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28(3):375-81.

Jin H, Evangelou E, Ioannidis JP, et al. Polymorphisms in the 5' flank of COL1A1 gene and osteoporosis: meta-analysis of published studies. *Osteoporos Int*. 2011; 22: 911-921.

Kalender WA. Effective dose values in bone mineral measurements by photon absorptiometry and computed tomography. *Osteoporos Int*. 1992; 2:82-87

Kammerer CM, Schneider JL, Cole SA, Hixson JE, Samollow PB, O'Connell JR, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 2p, 4p, and 13q influence bone mineral density of the forearm and hip in Mexican Americans. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(12):2245-2252.

Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken RJ, Rimpela M, Rose RJ. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol*. 1995; 67(5):739-753.

Karasik D, Hsu YH, Zhou Y, Cupples LA, Kiel DP, Demissie S. Genome-wide pleiotropy of osteoporosis-related phenotypes: the Framingham Study. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(7):1555-1563.

Kanis J, Melton J, Christiansen C, Johnston C, Khaltaev N. The Diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1994; 9(8): 1137-1141.

Kanis J. Diagnosis of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 1997; 7(S3): S108-S116.

Kaufman JM, Ostertag A, Saint-Pierre A, et al. Genome-wide linkage screen of bone mineral density (BMD) in European pedigrees ascertained through a male relative with low BMD values: evidence for quantitative trait loci on 17q21-23, 11q12-13, 13q12-14, and 22q11. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2008; 93: 3755-3762.

Keaveny TM, Hoffmann PF, Singh M, Palermo L, Bilezikian JP, Greenspan SL, Black DM. Femoral bone strength and its relation to cortical and trabecular changes after treatment with PTH, alendronate, and their combination as assessed by finite element analysis of quantitative CT scans. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(12):1974-82.

Kiel DP, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ, Baron JA, Felson DT. The effect of smoking at different life stages on bone mineral density in elderly men and women. *Osteoporos Int.* 1996; 6(3):240-248.

Koller DL, Econs MJ, Morin PA, et al. Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85: 3116-3120.

Koller DL, Econs MJ, Morin PA, et al. Genome screen for quantitative trait loci underlying normal variation in femoral structure, *J. Bone Miner. Res.* 2001;16: 985-991.

Laird NM, Horvath S, Xu X Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 2000; 19:S36–42.

LaCroix AZ, Beck TJ, Cauley JA, Lewis CE, Bassford T, Jackson R, Wu G, Chen Z. Hip structural geometry and incidence of hip fracture in postmenopausal women: what does it add to conventional bone mineral density? *Osteoporos Int.* 2010; 21(6):919-29.

Li HY, Kung WC, Huang QY. Bone mineral density is linked to 1p36 and 7p15-13 in a southern Chinese population. *J Bone Miner Metab.* 2011; 29(1):80-7.

Liu PY, Qin YJ, Zhou Q, Recker RR, Deng HW. Complex segregation analyses of bone mineral density in Chinese. *Ann Hum Genet.* 2004; 68( 2):154-64.

Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(10):1511-35.

Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 425:126-134.

Livshits G, Deng HW, Nguyen TV, Yakovenko K, Recker RR, Eisman JA. Genetics of bone mineral density: evidence for a major pleiotropic effect from an intercontinental study. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(6):914-923.

Medina-Gomez, C. et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the *WNT16* locus. *PLoS Gene.* 2012; 8(7):e1002718.



Lyles KW, Schenck AP, Colón-Emeric CS. Hip and other osteoporotic fractures increase the risk of subsequent fractures in nursing home residents. *Osteoporos Int*. 2008; 19(8):1225-33.

Mayhew PM, Thomas CD, Clement JG, et al. Relation between age, femoral neck cortical stability, and hip fracture risk. *Lancet*. 2005; 366: 129-135.

Melton LJ 3rd, Beck TJ, Amin S, Khosla S, Achenbach SJ, Oberg AL, Riggs BL. Contributions of bone density and structure to fracture risk assessment in men and women. *Osteoporos Int*. 2005; 16(5):460-7.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.

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

Moffett SP, Zmuda JM, Oakley JI, Beck TJ, Cauley JA, Stone KL, Lui LY, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Morin P, Peltz G, Greene D, Cummings SR. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism, bone strength phenotypes, and the risk of fracture in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(6):3491-7

Naganathan V, Macgregor A, Snieder H, Nguyen T, Spector T, Sambrook P . Gender differences in the genetic factors responsible for variation in bone density and ultrasound. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(4):725-733.

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(1):3-16.

Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(3):392-401.

Oden A, McCloskey EV, Johansson H, Kanis JA. Assessing the impact of osteoporosis on the burden of hip fractures. *Calcif Tissue Int*. 2013; 92(1):42-49.

Orwoll ES, Belknap JK, Klein RF. Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. *J Bone Miner Res*. 2001; 16(11):1962-1971

Park JH, Song YM, Sung J, Lee K, Kim YS, Park YS. Genetic influence on bone mineral density in Korean twins and families: the healthy twin study. *Osteoporos Int*. 2012; 23(4):1343-1349.

Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2002; 23(3):303-26.

Peacock M, Koller DL, Lai D, Hui S, Foroud T, Econs MJ. Bone mineral density variation in men is influenced by sex-specific and non sex-specific quantitative trait loci. *Bone*. 2009; 45(3):443-8.

Piters E, de Freitas F, Nielsen TL, Andersen M, Brixen K, Van Hul W. Association study of polymorphisms in the SOST gene region and parameters of bone strength and body composition in both young and elderly men: data from the Odense Androgen Study. *Calcif Tissue Int*. 2012; 90(1):30-9.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet*. 2007; 81:559-575.

Qureshi AM, McGuigan FE, Seymour DG, Hutchison JD, Reid DM, Ralston SH. Association between COLIA1 Sp1 alleles and femoral neck geometry. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69(2):67-72

Ralston SH, Uitterlinden AGM. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2010; 31(5):629-62.

Ran S, Pei YF, Liu YJ, Zhang L, Han YY, Hai R, Tian Q, Lin Y, Yang TL, Guo YF, Shen H, Thethi IS, Zhu XZ, Deng HW. Bivariate genome-wide association analyses identified genes with pleiotropic effects for femoralneck bone geometry and age at menarche. *PLoS One*. 2013; 4;8(4):e60362

Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ 3rd. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(1):24-35.

Reneland RH, Mah S, Kammerer S, Hoyal CR, Marnellos G, Wilson SG, Sambrook PN, Spector TD, Nelson MR, Braun A. Association between a variation in the phosphodiesterase 4D gene and bone mineral density. *BMC Med Genet*. 2005; 7:6-9.

Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008; 3;371(9623):1505-12.

Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(8):576-88.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3<sup>rd</sup>. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(5):763-73.

Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, Beck TJ, Janssen JA, Hofman A, Pols HA, Van Duijn CM. The influence of an insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism on hip bone geometry and the risk of nonvertebral fracture in the elderly: the Rotterdam Study. *Bone Miner Res.* 2004; 19(8):1280-90.

Rivadeneira F, van Meurs JB, Kant J, Zillikens MC, Stolk L, Beck TJ, Arp P, Schuit SC, Hofman A, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(9):1443-56.

Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Richards JB, Zillikens MC, Kavvoura FK, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Grundberg E, Hofman A, Kong A, Karasik D, van Meurs JB, Oostra B, Pastinen T, Pols HA, Sigurdsson G, Soranzo N, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Williams FM, Wilson SG, Zhou Y, Ralston SH, van Duijn CM, Spector T, Kiel DP, Stefansson K, Ioannidis JP, Uitterlinden AG; Genetic Factors for Osteoporosis (GEFOS) Consortium. Twenty bone mineral density loci identified by large-scale metaanalysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009; 41(11): 1199–1206.

Sambrook, P and Cooper, C. Osteoporosis. *Lancet.* 2006; 367(9527):2010-8.

Shen H, Liu Y, Liu P et al. Nonreplication in genetic studies of complex diseases—lessons learned from studies of osteoporosis and tentative remedies. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(3):365-76.

Simkin A, Ayalon J, Leichter I. Increased trabecular bone density due to bone-loading exercises in postmenopausal osteoporotic women. *Calcif Tissue Int.* 1987; 40:59-63.

Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the

potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res.* 1991; 6(6):561-567

Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(6):1875-1880.

Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol.* 2003; 1(3):E69.

Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med.* 2008; 358(22):2355-65.

Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat. Genet.* 2009; 41:15-17.

Tse KY, Macias BR, Meyer RS, Hargens AR. Heritability of bone density: regional and gender differences in monozygotic twins. *J Orthop Res.* 2009; 27(2):150-154.

Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type I alpha1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res.* 2001; 16(2):379-85.

Uitterlinden AG, Arp PP, Paepers BW, et al. Polymorphisms in the sclerostosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75:1032-1045.

Videman T, Levälahti E, Battié MC, Simonen R, Vanninen E, Kaprio J. Heritability of BMD of femoral neck and lumbar spine: a multivariate twin study of Finnish men. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(9):1455-62.

Willer, CJ, Scott LJ, Bonnycastle LL et al. Tag SNP selection for Finnish individuals based on the CEPH Utah HapMap database. *Genet Epidemiol.* 2006; 30(2):180-90.

Wilson, FS. Continuing medical education: ethical collaboration between sponsor and industry. *Clin Orthop Relat Res.* 2003; 412:33-7.

[www.ipaq.ki.se/scoring.pdf](http://www.ipaq.ki.se/scoring.pdf). Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) – Short and Long Forms. 2005; Accessed november.

Xiao P, Shen H, Guo YF, Xiong DH, Liu YZ, Liu YJ, Zhao LJ, Long JR, Guo Y, Recker RR, Deng HW. Genomic regions identified for BMD in a large sample including epistatic interactions and gender-specific effects. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(10):1536-44.

Xiong DH, Shen H, Xiao P, Guo YF, Long JR, Zhao LJ, Liu YZ, Deng HY, Li JL, Recker RR, Deng HW. Genome-wide scan identified QTLs underlying femoral neck cross-sectional geometry that are novel studied risk factors of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(3):424-37.

Yang TL, Zhao LJ, Liu YJ, Liu JF, Recker RR, Deng HW. Genetic and environmental correlations of bone mineral density at different skeletal sites in females and males. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78(4):212-217.

Zhang H, Hu YQ, Zhang ZL. Age trends for hip geometry in Chinese men and women and the association with femoral neck fracture. *Osteoporos Int.* 2011; 22(9):2513-22.

Zhao LJ, Liu XG, Liu YZ, Liu YJ, Papasian CJ, Sha BY, Pan F, Guo YF, Wang L, Yan H, Xiong DH, Tang ZH, Yang TL, Chen XD, Guo Y, Li J, Shen H, Zhang F, Lei SF, Recker RR, Deng HW. Genome-wide association study for femoral neck bone geometry. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(2):320-9.

Zheng HF, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet.* 2012; 8(7):e1002745.

Zintzaras E, Doxani C, Koufakis T, Kastanis A, Rodopoulou P, Karachalios T. Synopsis and meta-analysis of genetic association studies in osteoporosis for the focal adhesion family genes: the CUMAGAS-OSTEOPorosis information system. *BMC Med.* 2011; 26;9:9.

## **9. ANEXOS.**

ANEXO 1. DEFINICIONES DE LAS VARIABLE REGISTRADAS.

ANEXO 2. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA.

ANEXO 3.CEIC.

ANEXO 4. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ANEXO 5. MÉTODO DE HIP STRUCTURAL ANÁLISIS.

ANEXO 6. ARTICULO III.

## ANEXO 1. DEFINICIONES DE LAS VARIABLE REGISTRADAS:

- El nivel de exposición solar se define como la cantidad semanal de horas de exposición 11 a.m.-2:00 p.m.
- La ingesta de calcio en la dieta se define como el número de vasos de leche, porciones de yogur o queso que se consume semanalmente.
- La actividad física se cuantificó a través del Cuestionario Internacional de Actividad Físico . La actividad fue clasificada como alta, moderada o baja según el score categórico. (44: IPAQ Questionnaire'05) Anexo 3.
- El hábito de tabaco se evaluo como consumo activo o finalizado. El consumo se calculó como paquetes por año y tras haber finalizado el consumo, se midió el tiempo sin consumo en años.
- El hábito de consumo de alcohol se definio como no consumo, bajo consumo (menos de 30 g / día o 3 unidades), consumo moderado (entre 30 -40 g / d, 3-4 unidades) y consumo alto (más de 40 g / d ó 4 unidades).
- El consumo de café se estimó como 0, 1-2, 2-4 o > 4 tazas de café al día.
- El peso se midio en kilogramos (a menos de 0,1 kg de precisión), la altura en centímetros (a menos de 0,5 cm de precisión) y el índice de masa corporal (IMC) en  $\text{kg}/\text{m}^2$ .

## ANEXO 2. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA.

Argentina, 2002 de Agosto

### **CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FISICA**

#### **IPAQ: FORMATO CORTO AUTOADMINISTRADO DE LOS ULTIMOS 7 DIAS**

##### **PARA SER UTILIZADO CON ADULTOS JOVENES Y DE MEDIANA EDAD(15- 69 años)**

Los cuestionarios internacionales sobre actividad física (IPAQ) comprenden una serie de 4 cuestionarios. Las versiones disponibles son: largos (5 campos de actividad sobre los que se pregunta individualmente) y cortos (4 ítems genéricos), para ser utilizados por vía telefónica o autoadministrados. La finalidad de estos cuestionarios es proporcionar instrumentos comunes que puedan usarse para obtener información internacional comparable sobre la actividad física relacionada con la salud.

##### **Antecedentes de IPAQ**

El desarrollo de un sistema de medición internacional de la actividad física comenzó en Ginebra en 1998, y continuó con ensayos extensivos de confiabilidad y validación llevados a cabo en 12 países (14 lugares), en 6 continentes durante el 2000. Los resultados finales sugieren que estas mediciones tienen atributos aceptables de medición para aplicar en muchos escenarios y en diferentes idiomas, y son adecuados para los estudios de prevalencia basados en poblaciones nacionales sobre la participación en la actividad física.

##### **El uso de IPAQ**

Se alienta el uso de los instrumentos de IPAQ a nivel mundial para fines de monitoreo e investigación. Se recomienda no cambiar el orden o lenguaje de las preguntas, ya que esto afectaría las propiedades psicométricas de los instrumentos.

##### **Traducción del Inglés y Adaptación Cultural**

Se apoya la traducción del inglés para facilitar el uso mundial de IPAQ. La información sobre la disponibilidad de IPAQ en diferentes lenguas puede obtenerse en [www.ipaq.ki.se](http://www.ipaq.ki.se). Si se emprende una nueva traducción, recomendamos fuertemente el uso de los métodos de retro traducción disponibles en el sitio Web. De ser posible, por favor piense en hacer que su versión traducida de IPAQ esté disponible para otros como contribución al sitio Web de IPAQ. Detalles adicionales sobre la traducción y la adaptación cultural pueden descargarse desde el sitio Web.

##### **Desarrollos Adicionales de IPAQ**

La colaboración internacional con IPAQ está en marcha, y un **Estudio Internacional de Prevalencia de Actividad Física** está en progreso. Para información adicional vea el sitio Web.

##### **Más Información**

Información más detallada sobre el proceso de IPAQ y los métodos de investigación utilizados para desarrollar los instrumentos de IPAQ se encuentran disponibles en

Argentina, 2002 de Agosto

[www.ipaq.ki.se](http://www.ipaq.ki.se) y en Booth, M.L (2000). *Assessment of Physical Activity: An International Perspective. Research Quarterly for Exercise and Sport*, 71(2):s114-20. Otras presentaciones y publicaciones científicas sobre el uso de IPAQ se resumen en el sitio Web.

[www.ipaq.ki.se](http://www.ipaq.ki.se)



## CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FISICA

Estamos interesados en averiguar acerca de los tipos de actividad física que hace la gente en su vida cotidiana. Las preguntas se referirán al tiempo que usted destinó a estar físicamente activo en los **últimos 7 días**. Por favor responda a cada pregunta aún si no se considera una persona activa. Por favor, piense acerca de las actividades que realiza en su trabajo, como parte de sus tareas en el hogar o en el jardín, moviéndose de un lugar a otro, o en su tiempo libre para la recreación, el ejercicio o el deporte.

Piense en todas las actividades **intensas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Las actividades físicas **intensas** se refieren a aquellas que implican un esfuerzo físico intenso y que lo hacen respirar mucho más intensamente que lo normal. Piense *solo* en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos **10 minutos** seguidos.

1. Durante los **últimos 7 días**, ¿en cuantos realizó actividades físicas **intensas** tales como levantar pesos pesados, cavar, hacer ejercicios aeróbicos o andar rápido en bicicleta?

\_\_\_\_\_ días por semana

Ninguna actividad física intensa



**Vaya a la pregunta 3**

2. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a una actividad física **intensa** en uno de esos días?

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

No sabe/No está seguro

---

Piense en todas las actividades **moderadas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Las actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado que lo hace respirar algo más intensamente que lo normal. Piense *solo* en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos **10 minutos** seguidos.

3. Durante los **últimos 7 días**, ¿en cuántos días hizo actividades físicas **moderadas** como transportar pesos livianos, andar en bicicleta a velocidad regular o jugar dobles de tenis? **No** incluya caminar.

\_\_\_\_\_ días por semana

Ninguna actividad física moderada



**Vaya a la pregunta 5**

4. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a una actividad física **moderada** en uno de esos días?

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

No sabe/No está seguro

---

Piense en el tiempo que usted dedicó a **caminar** en los **últimos 7 días**. Esto incluye caminar en el trabajo o en la casa, para trasladarse de un lugar a otro, o cualquier otra caminata que usted podría hacer solamente para la recreación, el deporte, el ejercicio o el ocio.

5. Durante los **últimos 7 días**, ¿En cuántos **camino** por lo menos **10 minutos** seguidos?

\_\_\_\_\_ días por semana

Ninguna caminata

➡ **Vaya a la pregunta 7**

6. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a caminar en uno de esos días?

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

No sabe/No está seguro

---

La última pregunta es acerca del tiempo que pasó usted **sentado** durante los días hábiles de los **últimos 7 días**. Esto incluye el tiempo dedicado al trabajo, en la casa, en una clase, y durante el tiempo libre. Puede incluir el tiempo que pasó sentado ante un escritorio, visitando amigos, leyendo, viajando en ómnibus, o sentado o recostado mirando la televisión.

7. Durante los **últimos 7 días** ¿cuánto tiempo pasó **sentado** durante un **día hábil**?

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

No sabe/No está seguro

ANEXO 3. CEIC.



Sant Antoni M. Claret, 167 • 08025 Barcelona  
Tel. 93 291 90 00 • Fax: 93 291 94 27  
E-mail: santpau@hsp.santpau.es  
www.santpau.es

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

<b>TÍTULO: Estudio de las bases genéticas de la osteoporosis y el riesgo de fractura</b>		
<b>ORGANISMO: FUNDACIÓN MM</b>	<b>IP: Dr. J. CASADEMONT</b>	<b>SERVICIO: MEDICINA INTERNA</b>
<b>CÓDIGO: 08/015/821</b>		

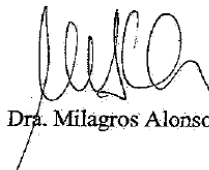

Doña **Milagros Alonso Martínez**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo,

**CERTIFICA:**

Que en su reunión de fecha 8 de Abril de 2008 este Comité ha analizado el proyecto de investigación de referencia para optar a una ayuda a la Investigación Médica 2008 de la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, y considera que se ajusta a las disposiciones vigentes.

Por ello, ha acordado informar favorablemente sobre su realización.

Y para que así conste, firma el presente en Barcelona, a 16 de Abril de 2008.

  
  
Dra. Milagros Alonso Martínez

**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

<b>TÍTULO: Identificación de los factores genéticos implicados en el riesgo de padecer osteoporosis</b>		
<b>ORGANISMO: FIS</b>	<b>IP: Dr. J. CASADEMONT</b>	<b>SERVICIO: MEDICINA INTERNA</b>
<b>CÓDIGO: 08/028/834</b>		

Doña **Milagros Alonso Martínez**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo,

**CERTIFICA:**

Que en su reunión de fecha 29 de Abril de 2008 este Comité ha analizado el proyecto de investigación de referencia para optar a una ayuda de la Acción Estratégica en Salud, en el marco del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, y considera que se ajusta a las disposiciones vigentes.

Por ello, ha acordado informar favorablemente sobre su realización.

Y para que así conste, firma el presente en Barcelona, a 30 de Abril de 2008.

  
 HOSPITAL DE LA  
SANTA CREU I  
SANT PAU  
COMITÉ ÉTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA  
Dra. Milagros Alonso Martínez

## ANEXO 4. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

### **Argumentos para otorgar el Consentimiento Informado.**

Este documento le ayudará a decidir sobre su participación en un proyecto de investigación genética sobre la osteoporosis, consistente en el estudio de familias grandes como la suya.

#### **¿Qué es una investigación genética basada en el estudio de familias completas?**

La investigación genética es fundamental para conocer el papel de los genes en la salud humana y en la enfermedad. Cada proyecto genético de investigación tiene sus propios objetivos. El objetivo puede ser descubrir nuevos genes, averiguar cómo funcionan los ya conocidos o aplicar el conocimiento sobre los genes para prevenir o tratar la enfermedad. Los investigadores deben explicar a los participantes los objetivos específicos del proyecto, antes de que estos decidan participar.

El objetivo fundamental de nuestro proyecto es encontrar los genes que provocan la osteoporosis. Para encontrar genes que causan osteoporosis es imprescindible investigar pacientes con esta enfermedad y también personas emparentadas con ellos. Por eso el método más eficaz consiste en estudiar familias enteras. En el proyecto que estamos llevando a cabo pretendemos incluir unas 25-30 familias con un total aproximado de 400 personas.

#### **¿Qué es el consentimiento informado?**

Antes del inicio del proyecto un grupo de expertos de diferentes ámbitos, llamado Comité Ético, revisó todo el diseño, métodos y criterios de inclusión de familias para asegurar que los investigadores explican bien sus intenciones y proteger a todas las personas que tomen parte en el mismo. Pero es muy importante que la decisión de participar sea tomada por todas y cada una de las personas afectadas. Este es el proceso que se conoce como “consentimiento informado” para que usted tome la decisión tan libremente como sea posible.

Cuando los investigadores le solicitan su consentimiento, le piden su aceptación voluntaria para participar en el estudio científico. Consentimiento informado significa más que meramente firmar la declaración. Significa que usted conoce los riesgos y los beneficios del estudio y que sabe cómo el estudio le puede afectar o no personalmente. Es imprescindible que usted acepte o rechace la participación libremente y que esta decisión no tenga ninguna consecuencia para los cuidados sobre su salud actuales o futuros. El equipo investigador debe exponerle toda la información que usted necesite para tomar su decisión. Lea con atención cualquier documento que se le entregue para firmar. No dude en preguntar cualquier asunto relacionado con el estudio que no haya comprendido. Su consentimiento debe ser otorgado cuando usted conoce claramente las implicaciones del estudio.

#### **¿Cuales son los beneficios de los estudios genéticos sobre enfermedades?**

La investigación de grupos familiares permite descubrir nuevos genes y su mecanismo de acción en las enfermedades humanas. El gran objetivo a medio y largo plazo es prevenirlas y tratar mejor a los pacientes. Al participar en un estudio genético usted contribuye al progreso de la ciencia y la medicina. No obstante, no debe esperar un beneficio personal directo. Habitualmente, los científicos no le darán ningún resultado

de sus análisis, porque ellos no están estudiando individuos aislados. Sin embargo, dada la naturaleza de nuestra investigación, su familia podría beneficiarse de algún hallazgo particular, con aplicaciones en la prevención de osteoporosis y fracturas, en algunos familiares concretos.

### **¿Cuales son algunos de los riesgos de participar en el estudio?**

Se va a necesitar una muestra de su sangre. El riesgo que comporta la extracción de sangre es muy pequeño. Por otro lado, existe el riesgo teórico de que si alguien ajeno a los investigadores obtuviera sus datos y los resultados de sus análisis, hiciera un uso inadecuado de esta información. Para su tranquilidad respecto a este riesgo usted debe saber que:

1. Sus muestras de sangre se procesarán de forma anónima, marcadas con un código numérico. La conexión entre sus datos clínicos, sus muestras de sangre y su código numérico se mantendrá siempre bajo secreto profesional. Los miembros del equipo investigador deben poder conocer el código por si necesitaran información adicional, por si tuvieran que comunicarle un resultado concreto y para el análisis estadístico de los resultados. Pero nadie más aparte de los investigadores conocerá su código secreto.
2. Al codificar sus muestras y sus datos, al menos una persona del estudio ha de tener acceso a los ficheros que conectan su nombre con su código y sus muestras de sangre. Se adoptarán medidas de seguridad para salvaguardar esta información, como son habitaciones privadas y cerradas u ordenadores de acceso restringido a los investigadores y bajo contraseñas.

### **¿Mis muestras serán usadas en otros proyectos de investigación genética?**

Algunas veces las muestras sobrantes de un proyecto se guardan adecuadamente (en general son congeladas) para su posible utilización en proyectos científicos ulteriores. En este caso, los investigadores deben informarle sobre cuanto tiempo se guardarían, quién podría usarlas y en qué tipo de investigación. A usted le corresponde autorizar o no este uso adicional de sus datos y su muestra. Los riesgos serían los mismos que ya se han descrito.

De todos modos, hay que comprender que el esfuerzo que supone participar en un proyecto y el enorme coste económico implicado se rentabiliza mucho más si las muestras pueden ser utilizadas en otros proyectos, siempre con el objetivo de combatir la enfermedad. Cualesquiera que fueran los estudios futuros, es imprescindible que los correspondientes Comités Éticos los supervisen y protejan los intereses de todos los participantes. Pero nadie puede conocer, hoy por hoy, los riesgos ni los beneficios exactos de estudios futuros que no han sido ni tan siquiera planificados.

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### **Título del estudio:** ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA OSTEOPOROSIS Y EL RIESGO DE FRACTURA

El Servei de Medicina Interna y la Unitat de Bioinformàtica de Malalties Complexes están realizando un estudio para conocer cómo afectan los genes al riesgo de padecer osteoporosis. Le pedimos su participación en el estudio porque o bien usted sufre esta patología o bien tiene algún familiar que la ha sufrido. Nuestra intención es investigar familias completas y extensas con casos de osteoporosis, hasta un total de más de 400 personas de todas las edades. Por favor, le rogamos que lea el documento anexo titulado *Argumentos para otorgar el Consentimiento Informado*.

La patología osteoporótica provoca problemas de salud muy serios a muchas personas. Sabemos que el riesgo de padecerla se relaciona con factores como la dieta, el ejercicio, el tabaco, el alcohol y también la constitución genética. El propósito principal de nuestro estudio es encontrar los genes (aún desconocidos) que influyen sobre el riesgo de osteoporosis. Esto nos ayudará en el futuro a conocer qué personas son susceptibles y a desarrollar medidas preventivas. Usted pertenece a una familia en la que se han diagnosticado casos de osteoporosis. Por eso le pedimos su colaboración.

Si usted decide participar, le realizaremos pruebas de medición de densidad ósea de cadera, columna vertebral y cuerpo entero y análisis estructural de la cadera. Estas pruebas nos ayudarán a predecir el riesgo de fractura. Estos procedimientos no son invasivos ni dolorosos y la radiación recibida es insignificante. Además, le extraeremos alrededor de unos 50 mL de sangre de una vena del brazo. De esta muestra de sangre obtendremos plasma, ADN y ARN para realizar múltiples análisis. Parte de la muestra se analizará inmediatamente y otra parte se almacenará para su estudio posterior.

También le realizaremos una encuesta clínica sobre su salud, dieta, medicaciones y hábitos como el consumo de tabaco, alcohol o tratamientos. Está usted en su derecho de no contestar a las preguntas que no crea convenientes. Así mismo le realizaremos algunas medidas importantes para el riesgo osteoporótico como peso, y talla. En total necesitaremos unos 5 minutos para la extracción de sangre y mediciones y unos 15 minutos para la entrevista clínica y 30 minutos para las pruebas de densitometría ósea. Es posible que transcurridos unos pocos años, le citemos de nuevo para realizar una segunda extracción de sangre y un seguimiento de su estado de salud.

Toda la información relativa a su persona (datos clínicos y resultados de los análisis) será estrictamente confidencial. Una vez obtengamos las muestras de sangre, les asignaremos un código numérico. Mantendremos los ficheros que relacionen su código con su nombre bajo medidas de seguridad y privacidad. Ni su nombre ni ningún dato que pueda señalarle aparecerán nunca en ninguna presentación o publicación de los resultados del estudio.

Este estudio no tiene prácticamente ningún riesgo físico para usted, excepto las mínimas molestias derivadas del pinchazo venoso para la extracción de sangre (breve y leve dolor, hematoma superficial y muy excepcionalmente

infección cutánea). Tomaremos todas las precauciones para evitar la infección. Algunas personas pueden marearse durante la extracción de sangre, pero esto se corrige o evita cuando se recuesta al paciente.

El tipo de información que obtendremos en este estudio probablemente no dirá nada específico sobre su salud personal. La posibilidad que alguien ajeno a los investigadores hiciera un mal uso de sus resultados o datos personales es muy pequeña. Sin embargo, para proteger su información, ni su nombre ni su dirección se guardarán junto a las muestras.

En caso de cualquier problema de salud derivado de su participación en el estudio, nos comprometemos a proporcionarle toda la asistencia necesaria.

El objetivo final de nuestro estudio es mejorar la salud pública. A veces, este tipo de investigación puede resultar en hallazgos que tengan valor comercial, en cuyo caso se podrían derivar patentes o licencias de explotación. Si esto ocurriera, los beneficios pueden revertir en los investigadores o en las organizaciones responsables del estudio, pero usted no recibiría ningún ingreso.

Este estudio no está diseñado para valorar su estado personal de salud. Por esta razón, no le será entregado ningún resultado de los análisis de su muestra de sangre. Sin embargo, es posible que se le envíen comunicaciones con los resultados generales o hallazgos científicos importantes. También serán publicados los resultados en revistas médicas y científicas especializadas.

Al finalizar el estudio, nos gustaría mantener las muestras biológicas sobrantes para investigaciones futuras, a menos que usted nos indique lo contrario. Las muestras se mantendrán congeladas bajo el control del equipo investigador del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. En todo caso, siempre un Comité Ético similar al que ha revisado este proyecto y protege sus derechos, revisará y aprobará cualquier proyecto científico futuro que se realice con su muestra.

#### **¿Cuáles son mis derechos como participante?**

Usted es libre de participar o no en el estudio. Si usted rehusa participar, mantiene completamente sus derechos asistenciales médicos y no sufrirá ningún tipo de reproche o castigo. Aunque decida participar en el estudio, usted podrá retirarse en cualquier momento y sus muestras de sangre serán destruidas y la información clínica eliminada de nuestras bases de datos. Usted puede elegir que las muestras sobrantes no sean usadas en futuras investigaciones y aún así seguir formando parte del presente estudio. Puede usted solicitar una copia de esta declaración de consentimiento para sus archivos.

#### **¿A quien debo llamar si tengo preguntas o problemas relacionados con el estudio?**

Para preguntas sobre el desarrollo del estudio o sus derechos de participación en el mismo, contactar con los Dres. Jordi Casademont o Jorge Malouf, responsables clínicos del estudio al teléfono 935565609 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.



## CONSENTIMIENTO Y FIRMAS

Acepto participar en el estudio, proporcionar una muestra de mi sangre y realizarme las pruebas de densidad y análisis estructural ósea. He tenido la oportunidad de realizar preguntas y obtener explicaciones satisfactorias relativas al estudio. Comprendo que los resultados individuales de mis análisis no me serán entregados. Se me ha ofrecido una copia de este documento de consentimiento.

Nombre del participante \_\_\_\_\_

Nombre del tutor o representante legal (en caso de menores o incapacitados)

\_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

He leído la parte relativa al almacenamiento de mis muestras para investigaciones futuras más allá del presente estudio. Mi elección al respecto es:

- Rechazo que mis muestras se almacenen o usen para ningún tipo de investigación distinta a la actual.
- Acepto que mis muestras se almacenen y se codifiquen para investigaciones médicas futuras.

FIRMA: \_\_\_\_\_

## ANEXO 6.

### **ARTICULO III:**

**Linkage and association analyses using families identified a locus affecting an osteoporosis-related trait.** Athanasiadis G, Malouf J, Hernandez-Sosa N, Martin-Fernandez L, Catalan M, Casademont J, Soria JM. *Bone*. 2014; Vol 60: 98-103. Factor Impacto: 3.82.

### **RESUMEN:**

La osteoporosis se caracteriza por una baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que condiciona un aumento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas. La base genética de la osteoporosis es compleja e implica múltiples genes y factores ambientales. Se presenta un estudio basado en familias con historia de osteoporosis – Proyecto de análisis genético de la osteoporosis (GAO) - para intentar descubrir variantes genéticas que afecten a fenotipos relacionados con la osteoporosis. En el Proyecto se incluyeron 11 familias extendidas de España, seleccionadas a través de un individuo afectado con osteoporosis (N = 367). Se realizó una densitometría de la columna vertebral, fémur y cuerpo total a todos los participantes y se analizó la resistencia y las propiedades geométricas de la cadera. Nuestro estudio se centró en 23 fenotipos densitométricos que consideramos de gran relevancia clínica y cuatro definiciones de baja masa ósea y presencia de fractura. La validación del pedigrí se realizó mediante estudio de microsatélites. Se realizó un análisis de ligamiento para la detección de señales descritas con anterioridad y otro con el potencial adecuado para la detección de nuevas señales. El análisis de ligamiento identificó una región denominada D17S787 con una señal fuerte y significativa con el parámetro de momento de inercia de la sección transversal del eje femoral (CSMI; LOD = 3,18;  $p = 6,5 \times 10^{-5}$ ). La localización cromosómica marcada por el microsatélite D17S787 puede incluir varios genes, con particular interés el COL1A1 y SOST, que codifica la alfa-1 de la cadena de colágeno y esclerostina, respectivamente. El análisis de

asociación presentó un resultado significativo para rs4792909 de la región genómica SOST ( $p = 0,00248$ ). En conclusión, nos proporciona un resultado importante y significativo de ligamiento y asociación entre el gen SOST y la resistencia de la diáfisis femoral. Las investigaciones futuras deberían estudiar la relación entre la formación de la masa ósea y las propiedades de resistencia ósea.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328213004985>

