

García-Giralt N¹, Yoskovitz G¹, Rodríguez-Sanz M¹, Urreiziti R², Guerri R^{1,3}, Prieto-Alhambra D^{1,4,5}, Mellibovsky L^{1,3}, Grinberg D², Balcells S², Nogués X^{1,3}, Díez-Pérez A^{1,3}

1 IMIM (Instituto de Investigaciones Médicas del Hospital del Mar) - RETICEF - Barcelona - España

2 Universidad de Barcelona - IBUB - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - ISCIII - Departamento de Genética - Barcelona - España

3 Servicio de Medicina Interna - Hospital del Mar - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona - España

4 Departamento NDORMS - Centro Ortopédico de Nuffield - Universidad de Oxford - Oxford - Reino Unido

5 IDIAP Jordi Gol - Instituto Catalán de Salud - Atención Primaria - Barcelona - España

SNPs en el 3'UTR de gen RANK determinan la fractura osteoporótica sitio-dependiente

Correspondencia: Natalia García-Giralt - IMIM-PRBB - c/Dr. Aiguader, 88 - 08003 Barcelona (España)
Correo electrónico: ngarcia@imim.es

Fecha de recepción: 01/03/2013

Fecha de aceptación: 05/06/2013

Resumen

Objetivos: El sistema RANK/RANKL/OPG está implicado en la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) y de la microarquitectura ósea. Nuestro estudio pretende evaluar si existen SNPs en la región 3'UTR del gen RANK asociados con fenotipos osteoporóticos.

Material y métodos: Se genotiparon siete variantes genéticas en 1.098 mujeres de la cohorte BARCOS, y se evaluó su asociación con la DMO y las fracturas osteoporóticas. Se testó una interacción con el SNP rs9594738 en el gen RANKL el cual fue previamente asociado con la DMO.

Resultados: Ninguno de los SNPs se asoció significativamente con la DMO. El SNP rs78326403 se asoció con fracturas de muñeca/antebrazo (Modelo Log-aditivo *odds ratio* (OR)=3,12 [IC 95%: 1,69 ; 5,75]; $p=7,16 \times 10^{-4}$), mientras que el SNP rs884205 se asoció con fracturas de columna vertebral (OR=4,05 Recesivo; [IC 95%: 1,59 ; 10,35]; $p=8,24 \times 10^{-3}$). Por último, se detectó una interacción entre el SNP rs9594738 del RANKL y el rs78326403 del RANK sobre la prevalencia de fractura ($p=0,039$). El análisis del efecto de los genotipos compuestos rs9594738 y rs78326403 dio un aumento de la prevalencia de fracturas en sujetos con un mayor número de alelos desfavorables, siendo las OR 2,76 [IC 95%: 1,30 ; 5,81]; $p=0,007$) y 5,14 [IC 95%: 1,37 ; 15,67]; $p=0,007$) para 2 y ≥ 3 alelos desfavorables, respectivamente, en comparación con ninguno/1.

Conclusiones: Dos SNPs en el 3'UTR del gen RANK predisponen a la fractura osteoporótica sitio-dependiente. Una interacción con el SNP rs9594738 del RANKL sugiere un efecto aditivo de la DMO y la resistencia ósea.

Palabras clave: osteoporosis, fractura, SNPs, estudios de asociación.

SNPs in the 3'UTR of the RANK gene determine site-dependent osteoporotic fracture

Summary

Objectives: The RANK/RANKL/OPG system is involved in the determination of bone mineral density (BMD) and bone microarchitecture. Our study seeks to evaluate if there are SNPs in the 3'UTR region of the RANK gene associated with osteoporotic phenotypes.

Material and methods: Seven genetic variants in 1,098 women from the BARCOS cohort were genotyped, and their association with BMD and osteoporotic fractures evaluated. An interaction with SNP rs9594738 in the RANKL gene which was previously associated with BMD was tested.

Results: None of the SNPs were associated significantly with BMD. SNP rs78326403 was associated with wrist/forearm fractures (Log-additive model odds ratio (OR)=3.12 [IC 95%: 1.69 ; 5.75]; $p=7.16 \times 10^{-4}$), while SNP rs884205 was associated with fractures of the spinal column (OR=4.05 Recessive; [95% CI: 1.59 ; 10.35]; $p=8.24 \times 10^{-3}$). Lastly, an interaction was detected between SNP rs9594738 from RANKL and rs78326403 from RANK on the presence of fracture ($p=0.039$). The analysis of the effects of combined genotypes rs9594738 and rs78326403 pointed to an increase in the prevalence of fractures in subjects with a greater number of unfavourable alleles, the ORs being 2.76 [95% CI: 1.30 ; 5.81]; $p=0.007$) and 5.14 [95% CI: 1.37 ; 15.67]; $p=0.007$) for 2 and ≥ 3 unfavourable alleles respectively, in comparison with none/1.

Conclusions: Two SNPs in 3'UTR from the RANK gene predispose to site-dependent osteoporotic fracture. An interaction with SNP rs9594738 from RANKL suggests an additive effect of BMD and bone strength.

Key words: osteoporosis, fracture, SNPs, association studies.

Introducción

La osteoporosis es uno de los problemas más comunes en las mujeres postmenopáusicas, con una carga económica importante para la sociedad occidental^{1,2}. Según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la osteoporosis se diagnostica de forma no invasiva midiendo la densidad mineral ósea (DMO)³. Los traumatismos de bajo impacto son la consecuencia inmediata de la osteoporosis y son una causa creciente de hospitalización, de morbilidad y de mortalidad entre los ancianos⁴. Sin embargo, la definición de estas fracturas de bajo traumatismo como "fracturas osteoporóticas" puede ser engañoso, ya que muchos de los pacientes tienen niveles de DMO considerados normales según los criterios de la OMS^{5,6}. Para mejorar la identificación de sujetos con alto riesgo de fractura, una serie de estudios⁷⁻⁹ han propuesto el uso clínico de varios predictores, incluyendo el algoritmo de la OMS FRAX¹⁰⁻¹², en lugar de sólo la DMO. La identificación de un número de predictores independientes a la DMO (como la historia familiar de fractura de cadera) indica que otros factores, probablemente relacionados con la microarquitectura u otros elementos de la resistencia ósea, juegan un papel importante en la definición de fractura osteoporótica.

El sistema de señalización RANK/RANKL/OPG es fundamental para el remodelado óseo. El ligando RANK (RANKL) es una proteína de membrana de la célula pre-osteoblástica o secretada por osteocitos que se une al receptor RANK del osteoclasto precursor, promoviendo así la diferenciación y activación de éste a osteoclasto maduro. El osteoblasto, a su vez, también segrega la proteína solu-

ble OPG, que actúa de receptor señuelo e interactúa con RANKL, impidiendo la unión de éste con RANK e inhibiendo así la osteoclastogénesis. El equilibrio entre OPG y RANKL y la unión de este último a su receptor RANK es clave en la determinación del estado anabólico o catabólico del hueso. De esta manera, el gen TNFRSF11A (locus 18q22.1), que codifica a RANK, tiene una importancia especial en el remodelado óseo, ya que determina la diferenciación de los osteoclastos y su supervivencia¹³. Una alteración en este complejo provocaría una desregulación del remodelado óseo pudiendo ocasionar estados patológicos, como sería la osteoporosis.

Estudios de asociación de todo el genoma¹⁴⁻¹⁷ y de análisis de interacción de SNPs de RANK/RANKL¹⁸ aportan evidencias de la importancia del gen TNFRSF11A para la determinación de la DMO y la incidencia de fracturas.

Cambios en la región 3'UTR de un gen pueden afectar a su expresión mediante la modulación de los sitios de unión de microRNAs (miRNAs)¹⁹. Además, se ha demostrado que miRNAs específicos pueden regular la osteogénesis²⁰. Por lo tanto, nuestra hipótesis de estudio consistió en que variantes genéticas en regiones 3'UTR de genes importantes para el metabolismo óseo pudieran estar asociadas a fenotipos osteoporóticos.

El objetivo fue identificar SNPs en el 3'UTR del gen RANK como posibles variantes funcionales genéticas que puedan afectar al riesgo de fractura. Por otro lado se estudió una posible interacción entre los SNPs asociados a fractura dentro del 3'UTR del gen de RANK con el SNP rs9594738 del gen RANKL (previamente asociado con la DMO)¹⁴.

Materiales y métodos

Características de la cohorte BARCOS

Todos los pacientes de la cohorte son mujeres postmenopáusicas que asistieron a la consulta externa de una visita inicial a causa de la menopausia en la Unidad de Metabolismo Óseo del Hospital del Mar-Parque de Salud Mar en Barcelona, España^{21,22}. Las pacientes se han recogido de manera consecutiva, no seleccionadas, y fueron reclutadas prospectivamente, independientemente de sus valores de DMO. Se registró la edad, el peso, la estatura, la edad de la menarquia, años desde la menopausia en el momento de la densitometría, meses de lactancia materna y los antecedentes de fracturas previas (Tabla 1). Se excluyeron las mujeres con enfermedades metabólicas o endocrinas, insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática crónica, cáncer (excepto cáncer de piel superficial), enfermedad de Paget del hueso, síndrome de mala absorción o con tratamiento de reemplazo hormonal, agentes antirresortivos o anabólicos, corticosteroides orales, fármacos antiepilépticos, litio, heparina o warfarina, así como aquéllas que declinaron la invitación a participar y no dieron su consentimiento informado. Además, los sujetos con una historia de menopausia temprana (<40 años de edad) fueron excluidos de este análisis. Las muestras de sangre y el consentimiento informado por escrito se obtuvieron de acuerdo con los reglamentos de la Comisión del Hospital del Mar de Investigación Genética en Humanos.

Determinación de la DMO y de la fractura

Se utilizó el densitómetro de energía dual de rayos X, DXA (QDR 4500 SL, Hologic, Waltham, MA, EE.UU.) para medir la DMO (g/cm^2) en columna lumbar (LS) L2-L4 y en cuello del fémur (FN). La técnica tiene un coeficiente de variación (CV) de 1,0% para la medición de LS y 1,65% para la de FN. Se registraron las fracturas vertebrales y no vertebrales clínicas. Las fracturas no vertebrales se validaron mediante los registros médicos, y las de columna vertebral mediante radiografías si había antecedentes de diagnóstico de fractura vertebral, pérdida de altura, o dolor de espalda. Se definieron como fracturas osteoporóticas aquéllas que se producían después de los 45 años y debido a un traumatismo de bajo impacto. Las fracturas de cara, dedos de manos y pies, y del cráneo fueron excluidas. Las fracturas vertebrales se definieron de acuerdo con los criterios semicuantitativos de Genant *et al.*²³.

Extracción de ADN

Se obtuvieron los *buffy coats* a partir de 3 ml de sangre recogida en tubos de EDTA y se almacenaron a -20°C . El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos mediante un procedimiento de *salt-ting-out*²⁴ o por Autopure LS (Qiagen), una estación de trabajo robotizada para la purificación automatizada de ADN genómico, en los laboratorios de Servicios de Apoyo de Laboratorio Biomédico, IMIM, Barcelona (España), y almacenado a -20°C .

Selección de los SNPs y genotipado

Se utilizaron las bases de datos del Ensembl (www.ensembl.org) y del Entrez SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) para seleccionar SNPs del 3'UTR del gen RANK. Sólo se incluyeron los SNPs con una MAF $>0,01$.

El genotipado de los polimorfismos se realizó en Kbioscience (Herts, Inglaterra) utilizando el sistema de Kaspar v4.0 y el algoritmo Kraken alelo. Para el control de calidad, se genotiparon 959 muestras para el SNP rs9594738 (alrededor de 11% del genotipado total) utilizando el Sistema de SNPlex (Applied Biosystem) de la plataforma CEGEN (Barcelona, España). Había 99,8% de concordancia entre los resultados de las dos técnicas.

Métodos estadísticos

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se calculó mediante la prueba de Chi-cuadrado, y el valor *p* se calculó con la calculadora de la Universidad de Tufts *online* ([Http://www.tufts.edu/~mccourt01/Documents/Court 20lab% 20 -% 20calculator.xls](http://www.tufts.edu/~mccourt01/Documents/Court%20lab%20-%20calculator.xls) 20HW%).

Para evaluar la asociación de los SNPs genotipados con la DMO y las fracturas se utilizaron modelos ajustados de regresión lineal y logística, respectivamente. Los factores de confusión considerados para el ajuste fueron el índice de masa corporal (IMC)²⁵ y la edad para la asociación con fractura; y la edad de la menarquia, años desde la menopausia en el momento de la densitometría, los meses de lactancia materna y el IMC²⁵ para la DMO. Con la hipótesis de que el efecto sobre el fenotipo fractura de las diferentes variantes genéticas de RANK puede variar en función de la arquitectura ósea, se estudió el efecto de los SNPs tanto en los sitios de fractura predominantemente trabecular (columna vertebral) como en los sitios con más hueso cortical (muñeca/antebrazo).

Aparte, se testaron interacciones entre el rs9594738 del gen RANKL y los SNPs asociados a fractura del RANK al introducir términos multiplicativos en la ecuación de regresión.

Todos los análisis fueron de dos colas y los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows versión 13.0 y la versión R 2.13.2 con haplo.stats, epicalc, SNPassoc, foreign, rms, y packs de genética.

Resultados

Se genotiparon siete variantes genéticas del 3'UTR del gen RANK en la cohorte BARCOS (Tabla 2). Todos los SNPs, excepto el rs72933640, estaban en HWE. Sin embargo, la MAF del rs72933640 en BARCOS era muy similar a la MAF (0.108) publicada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en población CEU. La MAF de todos los SNPs genotipados fue $>0,01$ en nuestra población. El SNP rs78326403 y rs78459945 estaban en total desequilibrio de ligamiento (LD) ($D' = 0,999$; $R^2 = 0,968$). Este último, al tener una menor eficiencia de genotipado, se eliminó del análisis estadístico.

Tabla 1. Características basales de la cohorte BARCOS

| Características de las pacientes | Media ± DS | n |
|-----------------------------------|--------------|------------|
| Edad de la menopausia (años) | 48,46 ± 4,06 | 1096 |
| IMC | 26,16 ± 3,85 | 1088 |
| Lactancia (meses) | 7,73 ± 12,79 | 1091 |
| Edad a la densitometría LS (años) | 56,04 ± 8,49 | 1087 |
| Años desde la menopausia LS | 7,59 ± 8,26 | 1091 |
| DMO LS (g/cm ²) | 0,853 ± 0,15 | 1092 |
| Edad a la densitometría FN (años) | 57,89 ± 8,03 | 1003 |
| Años desde la menopausia FN | 9,36 ± 7,91 | 1007 |
| DMO FN (g/cm ²) | 0,683 ± 0,11 | 1009 |
| Edad menarquia (años) | 12,89 ± 1,58 | 1081 |
| Fracturas: | 152 (13,8%) | 1098 |
| Columna | | 68 (44,7%) |
| Cadera | | 8 (5,3%) |
| Muñeca/Antebrazo | | 36 (23,7%) |
| Otras | | 40 (26,3%) |

Ninguno de los SNPs estudiados se encontró asociado con la DMO (datos no mostrados). Por el contrario, los SNPs rs78326403 y rs884205 se asociaron significativamente con la prevalencia de fractura en nuestra cohorte (Figura 1 y tabla 2). Para el SNP rs78326403, el modelo log-aditivo dio un valor de $p=0,053$; OR=1,58 [IC 95%: 1,00 ; 2,49]. Para el SNP rs884205, el modelo log-aditivo dio un valor de $p=0,048$ con OR=1,40 [IC 95%: 1,01 ; 1,95], mientras que el modelo recesivo producido $p=4,9 \times 10^{-3}$; OR=3,28 [IC 95%: 1,51 ; 7,13]. Sólo el SNP rs884205 superó la corrección de Bonferroni (valor p para la asociación significativa: $p=8,33 \times 10^{-3}$) (Figura 1). No se detectó una interacción significativa entre ellos ($p=0,87$).

A continuación se analizaron ambos SNPs para su asociación con fracturas de columna vertebral o muñeca/antebrazo por separado (Tabla 3). El SNP rs78326403 se asoció con fracturas de muñeca/antebrazo (modelo Log-aditivo, $p=7,16 \times 10^{-4}$; OR=3,12 [IC 95%: 1,69 ; 5,75]), pero no con fracturas vertebrales ($p=0,78$, modelo log-aditivo). Por el contrario, el SNP rs884205 estuvo asociado con las fracturas de columna (modelo recesivo, $p=8,24 \times 10^{-3}$; OR=4,05 [IC 95%: 1,59 ; 10,35]), pero no con fracturas de muñeca/antebrazo ($p=0,66$, modelo log-aditivo). En este caso, ambos SNPs superaron la corrección de Bonferroni. Después del ajuste adicional con la DMO, ambas asociaciones siguieron siendo significativas (Tabla 3) aunque la asociación nominal entre el rs884205 y las fracturas de columna vertebral después de ajustar por la LS DMO no superó la correc-

ción de Bonferroni (modelo recesivo $p=0,025$).

El análisis de la interacción entre el SNP de RANKL rs9594738, previamente asociado a la DMO, y el rs78326403, considerando como variable las fracturas de muñeca/antebrazo, produjo un resultado significativo ($p=0,039$). Teniendo en cuenta la fractura de columna, no hubo interacción entre el rs9594738 y el rs884205 ($p=0,39$). Tampoco se ha encontrado ninguna interacción significativa cuando la variable de estudio era la DMO. El análisis del efecto de los genotipos compuestos de los SNPs rs9594738 y rs78326403 apuntaba hacia el aumento de la prevalencia de fracturas en sujetos con un mayor número de alelos desfavorables (Tabla 4). Debido a diferencias menores o nulas entre portadoras de ningún o un solo alelo desfavorable sobre la prevalencia de fractura, se combinaron ambas categorías. Asimismo, debido al pequeño número de pacientes con 4 alelos desfavorables ($n=3$), esta categoría se fusionó con el

grupo de 3 alelos desfavorables. En general, se realizó la comparación de la siguiente manera: 0/1 *vs.* 2 y 0/1 *vs.* 3 o más alelos desfavorables. El análisis del efecto de estos genotipos compuestos sobre la prevalencia de fractura sugiere un efecto aditivo con las correspondientes OR ajustadas: 2,76 [IC 95%: 1,30 ; 5,81], $p=7,4 \times 10^{-3}$; y 5,14 [IC 95%: 1,37 ; 15,67]; $p=7,5 \times 10^{-3}$, para 2 y ≥ 3 alelos desfavorables, respectivamente (Tabla 4).

Discusión

El equilibrio del remodelado óseo es, en parte, regulado por el sistema RANK/RANKL/OPG. Es por ello que este sistema se ha estudiado bien en el campo de la osteoporosis. A la luz del creciente interés por los miRNAs como elemento regulador epigenético, este estudio se ha centrado en SNPs, situados en el 3'UTR del gen RANK, que pueden afectar a la unión de miRNAs. Se han genotipado 7 SNPs en esta región, resultando en dos de ellos asociados a fractura osteoporótica. Las bases de datos disponibles hasta la fecha ofrecen poca información, la mayor parte *in silico* y basado en algoritmos, en cuanto a los sitios de unión de miRNAs en la región 3'UTR de RANK. Estas bases de datos, además, no aportan ninguna información sobre las secuencias genómicas que contienen los SNPs asociados a fractura. Por lo tanto, no tenemos datos sobre miRNAs que puedan unirse a la región que contiene los SNPs significativos, y por ello serían necesarios estudios funcionales para aclarar esta cuestión.

Tabla 2. Lista de los SNPs genotipados, MAF y valores de p para la asociación con fracturas bajo un modelo log-aditivo (u otro modelo si está indicado)

| SNP # | rs | Localización ¹ | Eficiencia | MAF BARCOS | HWE | p | OR (IC 95%) |
|-------|------------|---------------------------|------------|-------------------|--------------|--|------------------|
| 1 | rs78622775 | 18:60052935 | 0,95 | 0,01 ² | 0,73 | (0,99) ^c | |
| 2 | rs12455323 | 18:60053891 | 0,94 | 0,32 | 0,90 | 0,82 | |
| 3 | rs72933640 | 18:60054077 | 0,94 | 0,12 | 0,005 | 0,59 | |
| 4 | rs78326403 | 18:60054440 | 0,95 | 0,08 | 0,27 | 0,053 (0,022) ^o | 1,83 (1,11-3,02) |
| 5 | rs78459945 | 18:60054757 | 0,94 | 0,08 | 0,39 | En DL con rs78326403 | |
| 6 | rs72933641 | 18:60054804 | 0,95 | 0,13 | 0,07 | 0,57 | |
| 7 | rs884205 | 18:60054857 | 0,94 | 0,19 | 0,32 | 0,048 (0,0049) ^r | 3,28 (1,51-7,13) |

¹: ENSEMBL *website*, release 66, Febrero 2012.

²: Debido a la baja MAF para el rs78622775, el único modelo posible es el codominante. En el caso de que se consiga un p valor mas significativo en otro modelo, éste se indica entre (). Negrita p<0,05; ^c: codominante;

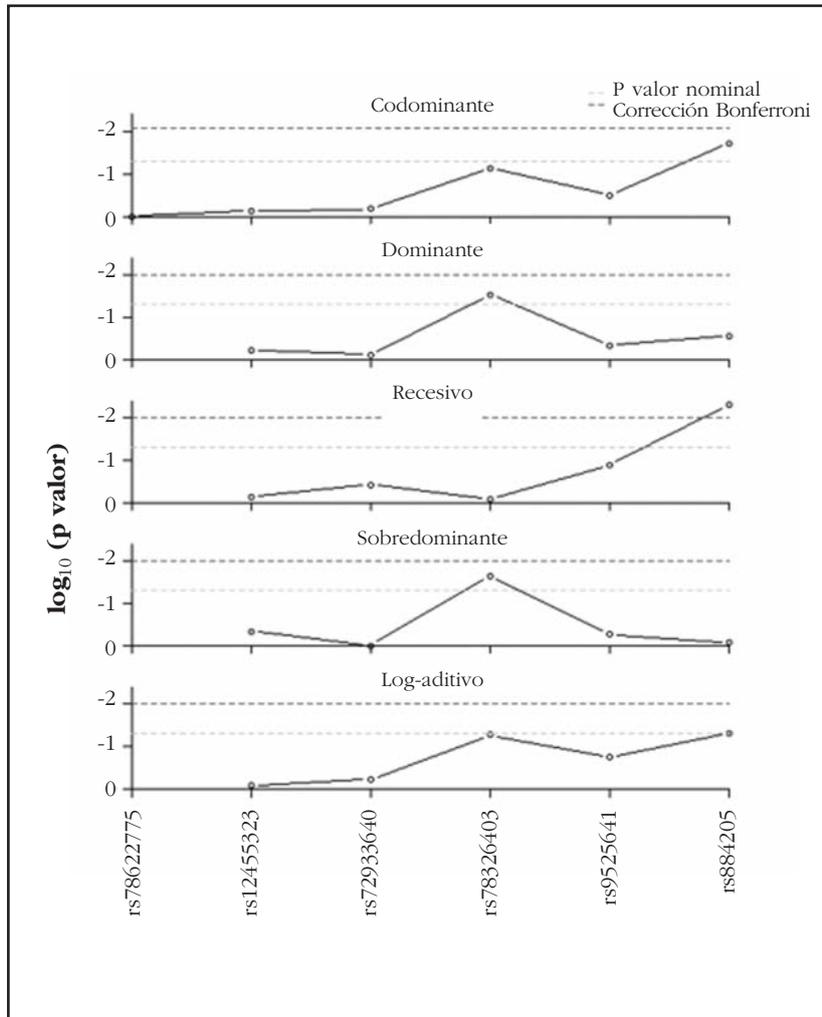
^o: sobredominante; ^r: recesivo.

En los últimos años se ha profundizado en el estudio de la genómica así como de los sucesos que acontecen desde la expresión génica hasta la proteína final, es decir, todos aquellos pasos y moléculas implicadas desde que un gen se expresa dando lugar al mRNA primario hasta la proteína funcional operativa, pasando por todo el proceso de regulación tanto de la transcripción como de la traducción. Los microRNAs (miRNAs o miRs) forman parte de esta dimensión en la regulación génica. Los miRNAs son RNAs pequeños de cadena sencilla (*short single-stranded RNAs*, ssRNAs), de 19-25 nucleótidos generados a partir de transcritos endógenos con forma de *hairpin*, y se encuentran evolutivamente conservados. Su función consiste en el silenciamiento post-transcripcional de genes mediante el apareamiento a la región 3'UTR del mRNA diana, provocando el corte del mRNA y así la represión de la traducción de dicho RNA. Un determinado miRNA puede actuar a nivel de varios genes, así como varios miRNAs diferentes pueden actuar sobre el mismo gen. Si el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es sólo parcial, se produce una represión traduccional y posterior degradación. Si el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es perfecto (o casi), se produce el corte y degradación.

La mayoría de las dianas de los miRNAs identificadas están en el 3'UTR de los RNAs mensajeros, que incluyen factores de transcripción, receptores y quinasas. Los miRNAs regulan la traducción proteica y la estabilidad del mRNA y de esta manera pueden modificar numerosas vías relacionadas con el desarrollo y las enfermedades. Diferentes estudios han mostrado que variantes genéticas en las secuencias de los miRNAs así como en sus secuencias diana en los 3'UTR de los genes pue-

den alterar el mecanismo de regulación de la expresión génica y en consecuencia dar lugar a diversas patologías¹⁹. Lei *et al.* identificaron 3 polimorfismos situados en potenciales sitios de unión para 9 miRNAs en el 3'UTR del gen FGF2 que fueron asociados a la DMO de cadera²⁶. Hemos identificado 2 SNP en región 3'UTR del gen RANK, el rs78326403 y el rs884205, que están asociados con las fracturas osteoporóticas en la cohorte BARCOS. En un posterior análisis, cada SNP mostró una asociación más fuerte en función del sitio de fractura estudiado: el rs78326403 se encontró asociado solamente con fracturas de muñeca/antebrazo mientras que el rs884205 se asoció sólo con fracturas de columna vertebral. Además, el ajuste de los resultados con la correspondiente DMO (FN-DMO para rs78326403 y LS-DMO para rs884205) no cambió la asociación del rs78326403, mientras que atenuó la asociación del rs884205 con fractura. Estos hallazgos sugieren que diferentes SNPs en el gen de RANK, incluso situados en la misma región, pueden influir diferencialmente en un determinado sitio de fractura (hueso cortical *vs.* trabecular). Estas asociaciones con diferentes tipos de fractura sugieren un mecanismo distinto de regulación del metabolismo óseo en huesos predominantemente corticales frente a huesos predominantemente trabeculares. Otros factores también han mostrado la capacidad de regular diferencialmente hueso cortical y trabecular, tales como el eje GH-IGF-1²⁷⁻³⁰ o las hormonas gonadales³¹⁻³⁴. Cabe mencionar que estas hormonas regulan el remodelado óseo a través de RANK/RANKL/OPG³⁵⁻³⁹. Por lo tanto, parece plausible que las distintas señales hormonales puedan efectuar su acción a través de diferentes elementos del sistema RANK/RANKL.

Figura 1. Resultados del estudio de asociación de los SNPs genotipados con la prevalencia de la fractura osteoporótica en la cohorte BARCOS para todos los modelos estadísticos, presentados como $-\log_{10}(\text{valor } p)$. En cada una de las gráficas, la línea del umbral mas bajo representa $p=0,05$, y la línea mas alta representa el valor p necesario después de la corrección Bonferroni ($p=8,33 \times 10^{-3}$)



Ésta es la primera vez que el SNP rs78326403 se ha asociado con fracturas; el SNP rs884205 se había relacionado previamente a fenotipos osteoporóticos^{16,40}. En un reciente meta-análisis llevado a cabo por el consorcio GEFOS-GENOMOS⁴¹, que incluye la cohorte BARCOS, el rs884205 se asoció con la DMO, pero no con fracturas. Esta diferencia puede deberse a la heterogeneidad entre las distintas cohortes en la evaluación de la fractura por parte de los diferentes grupos del consorcio. Una replicación futura debe clarificar la asociación de este SNP con el riesgo de fractura.

Por último, una interacción significativa entre el SNP rs9594738 del RANKL, que está asociado con la DMO, y el rs78326403, sugiere un efecto epistático entre RANK y RANKL. En concordancia con estos resultados, en el estudio de los genotipos compuestos se comprobó que había un efecto aditivo de los alelos de los dos SNPs. De esta manera, las portadoras de más alelos desfavorables tienen un riesgo

mayor (OR=5,14) de sufrir fractura respecto las portadoras de los genotipos más favorables.

De acuerdo con nuestros datos, numerosos estudios genéticos de asociación han demostrado una heredabilidad diferente para la DMO y la fractura (o calidad del hueso)¹⁴⁻¹⁶. Sin embargo, es ampliamente conocido que estos fenotipos osteoporóticos están estrechamente relacionados, y nuestros resultados refuerzan esta premisa. En consecuencia, se deberían considerar tanto la DMO baja y otras mediciones adicionales de la calidad del hueso o microarquitectura para evaluar con precisión el riesgo de fractura en el ámbito clínico. Estos hallazgos pueden ser clínicamente relevantes en el futuro para un enfoque más específico para los diferentes tipos de fracturas, tanto para comprender mejor sus mecanismos subyacentes como para buscar estrategias terapéuticas más específicas.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. La muestra disponible es relativamente pequeña (1.098 mujeres) teniendo un número limitado de fracturas, y esto reduce el poder estadístico del estudio y, por lo tanto, nuestra capacidad de identificar y analizar genotipos

raros. Además, nuestros resultados podrían ser específicos de la población estudiada, que se limita a mujeres caucásicas postmenopáusicas mediterráneas. Otros estudios en cohortes más grandes con características diferentes podrían determinar si las asociaciones que reportamos son replicables.

En conclusión, hemos identificado 2 SNP en el 3'UTR de gen RANK (rs78326403 y rs884205), que están asociados con las fracturas osteoporóticas. En nuestra cohorte, cada uno de los SNPs está asociado con un sitio de fractura específico. También se ha encontrado una interacción significativa entre el rs78326403 y un SNP (rs9594738) en el gen RANKL asociado con la DMO destacando la importancia de la DMO y la microarquitectura como predictores genéticamente determinados del riesgo de fractura.

Declaración de intereses: Todos los autores declaran la no existencia de conflictos de intereses.

Tabla 3. Resultados significativos de la asociación entre los SNPs rs884205 y rs78326403 y el sitio de fractura

| SNP | Sitio fractura | n | n fracturas | p | OR | IC 95% | p ¹ | OR ¹ | 95% CI ¹ |
|------------|----------------------|-------|-------------|------------------------|------|------------|-----------------------|-----------------|---------------------|
| rs78326403 | Muñeca/ antebrazo | 1.033 | 34 | 7,16x10 ^{-4a} | 3,12 | 1,69-5,75 | 5,8x10 ^{-4a} | 3,21 | 1,74-5,94 |
| rs884205 | Columna | 1.029 | 62 | 8,24x10 ^{-3r} | 4,05 | 1,59-10,35 | 0,025 ^r | 3,31 | 1,24-8,82 |

¹: Resultado tras la corrección por DMO: DMO del cuello del fémur para el rs78326403 y de la columna para el rs884205; ^r: recesivo; ^a: log-aditivo.

Tabla 4. Análisis del efecto de los genotipos compuestos de los SNPs rs9594738 y rs78326403: 0/1 alelos desfavorables como grupo de referencia *vs.* 2 y ≥3 alelos desfavorables

| Interacción | n alelos desfavorables | n | n individuos con fracturas (%) | Grupos | p | OR | IC 95% |
|-------------------|------------------------|-----|--------------------------------|---------------------|----------------------|------|------------|
| | 0 | 266 | 7 (2,6%) | Grupo de referencia | | | |
| rs9594738x | 1 | 476 | 9 (1,9%) | | | | |
| rs78326403 | 2 | 244 | 14 (5,7%) | 0/1 <i>vs.</i> 2 | 7,4x10 ⁻³ | 2,76 | 1,30-5,81 |
| | 3 | 33 | 4 (12,1%) | 0/1 <i>vs.</i> 3/4 | 7,5x10 ⁻³ | 5,14 | 1,37-15,67 |
| | 4 | 3 | 0 (0%) | | | | |

Bibliografía

- Knapp KM, Blake GM, Spector TD, Fogelman I. Can the WHO definition of osteoporosis be applied to multi-site axial transmission quantitative ultrasound? *Osteoporos Int* 2004;15:367-74.
- Riggs BL, Melton LJ, 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* 1995;17:505S-11S.
- Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-41.
- Shepstone L, Fordham R, Lenaghan E, Harvey I, Cooper C, Gittoes N, et al. A pragmatic randomised controlled trial of the effectiveness and cost-effectiveness of screening older women for the prevention of fractures: rationale, design and methods for the SCOOP study. *Osteoporos Int* 2012;23:2507-15.
- Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004;34:195-202.
- Hillier TA, Cauley JA, Rizzo JH, Pedula KL, Ensrud KE, Bauer DC, et al. WHO absolute fracture risk models (FRAX): do clinical risk factors improve fracture prediction in older women without osteoporosis? *J Bone Miner Res* 2011;26:1774-82.
- Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2005;20:1813-9.
- Baim S, Leslie WD. Assessment of Fracture Risk. *Curr Osteoporos Rep* 2012;10:28-41.
- Leslie WD, Morin S, Lix LM, Johansson H, Oden A, McCloskey E, et al. Fracture risk assessment without bone density measurement in routine clinical practice. *Osteoporos Int* 2012;23:75-85.
- Sornay-Rendu E, Munoz F, Delmas PD, Chapurlat RD. The FRAX tool in French women: How well does it describe the real incidence of fracture in the OFELY cohort? *J Bone Miner Res* 2010;25:2101-7.
- González-Macías J, Marín F, Vila J, Díez-Pérez A. Probability of fractures predicted by FRAX(R) and observed incidence in the Spanish ECOSAP Study cohort. *Bone* 2012;50:373-7.
- Kanis JA, Oden A, Johansson H, Borgstrom F, Strom O, McCloskey E. FRAX and its applications to clinical practice. *Bone* 2009;44:734-43.
- Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol* 2010;184:6910-9.
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008;358:2355-65.
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41:15-7.
- Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41:1199-206.
- Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 2011;7:e1001372.
- Zupan J, Mencej-Bedrac S, Jurkovic-Mlakar S, Prezelj J, Marc J. Gene-gene interactions in RANK/RANKL/OPG system influence bone mineral density in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;118:102-6.
- Landi D, Gemignani F, Landi S. Role of variations within microRNA-binding sites in cancer. *Mutagenesis* 2012;27:205-10.
- Dong S, Yang B, Guo H, Kang F. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418:587-91.

21. Bustamante M, Nogués X, Agueda L, Jurado S, Wesselius A, Cáceres E, et al. Promoter 2 -1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck BMD in Spanish postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2007;81:327-32.
22. Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Cáceres E, et al. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 2007;157:677-84.
23. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 1993;8:1137-48.
24. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
25. Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Avilés F, Hermosilla E, Martínez-Lagunam D, Carbonell-Abella C, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2012;27:294-300.
26. Lei SF, Papasian CJ, Deng HW. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2011;26:72-8.
27. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002;110:771-81.
28. Hamrick MW, Ding KH, Ponnala S, Ferrari SL, Isaacs CM. Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. *J Bone Miner Res* 2008;23:870-8.
29. Moyer-Mileur LJ, Slater H, Jordan KC, Murray MA. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. *J Bone Miner Res* 2008;23:1884-91.
30. Yakar S, Canalis E, Sun H, Mejia W, Kawashima Y, Nasser P, et al. Serum IGF-1 determines skeletal strength by regulating subperiosteal expansion and trait interactions. *J Bone Miner Res* 2009;24:1481-92.
31. Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. *J Clin Invest* 1999;104:895-901.
32. Lorentzon M, Swanson C, Andersson N, Mellstrom D, Ohlsson C. Free testosterone is a positive, whereas free estradiol is a negative, predictor of cortical bone size in young Swedish men: the GOOD study. *J Bone Miner Res* 2005;20:1334-41.
33. Taes Y, Lapauw B, Griet V, De Bacquer D, Goemaere S, Zmierzak H, et al. Prevalent fractures are related to cortical bone geometry in young healthy men at age of peak bone mass. *J Bone Miner Res* 2010;25:1433-40.
34. Vanbillemont G, Lapauw B, Bogaert V, Goemaere S, Zmierzak HG, Taes Y, et al. Sex hormone-binding globulin as an independent determinant of cortical bone status in men at the age of peak bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1579-86.
35. Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu L, Fan X, Murphy TC, Nanes MS, et al. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4273-9.
36. Zhao HY, Liu JM, Ning G, Zhao YJ, Chen Y, Sun LH, et al. Relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and OPG, RANKL, bone mineral density in healthy Chinese women. *Osteoporos Int* 2008;19:221-6.
37. Taxel P, Kaneko H, Lee SK, Aguila HL, Raisz LG, Lorenzo JA. Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos Int* 2008;19:193-9.
38. Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2005;20:2224-32.
39. Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4:268-75.
40. Guo Y, Wang JT, Liu H, Li M, Yang TL, Zhang XW, et al. Are bone mineral density loci associated with hip osteoporotic fractures? A validation study on previously reported genome-wide association loci in a Chinese population. *Genet Mol Res* 2012;11:202-10.
41. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44:491-501.