

Análisis del polimorfismo *Bsm I* del gen receptor de la vitamina D (*VDR*) en pacientes venezolanas residentes del estado Zulia con osteoporosis

Lisbeth Borjas-Fajardo¹, Mariana Zambrano², Erika Fernández¹, Lennie Pineda¹, Alisandra Machín¹, Pilar de Romero², William Zabala¹, María Alejandra Sánchez¹, José Antonio Chacín¹ y Wilmer Delgado¹.

¹Laboratorio de Genética Molecular. Unidad de Genética Médica y

²Cátedra de Bioquímica Clínica, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Osteoporosis, gen *VDR*, polimorfismo *Bsm I*, Venezuela.

Resumen. Dentro de los genes implicados en el estudio de la genética de la osteoporosis, el más conocido es el gen receptor de la vitamina D (*VDR*), estudiado a través de la caracterización del polimorfismo *Bsm I*. En tal sentido, esta investigación tuvo como objetivo principal analizar el polimorfismo *Bsm I* del gen de *VDR* en una muestra de 133 mujeres posmenopáusicas distribuidas en tres grupos: 54 afectadas con osteoporosis, 24 con osteopenia y 55 controles normales para la enfermedad. De las mujeres con osteoporosis 28 presentaron el genotipo BB, asociado en otros países con disminución de la densidad mineral ósea, 20 presentaron el genotipo Bb y 6 el genotipo bb. Del grupo control sólo 11 mujeres presentaron el genotipo BB, 36 mostraron el genotipo heterocigoto Bb y 8 el genotipo bb. La frecuencia de los alelos B y b en la población general analizada resultó de 0,6 y 0,4, respectivamente. El genotipo BB se encontró en un 52% del grupo con osteoporosis y en un 20% en el grupo control normal, siendo estos hallazgos significativos estadísticamente, lo cual sugiere una asociación entre el genotipo BB y la osteoporosis.

Analysis of *Bsm I* polymorphism of the Vitamin D receptor gen (VDR) in Venezuelan patients with osteoporosis

Invest Clín 2003; 44(4): 275 - 282

Key words: Osteoporosis, VDR gene, *Bsm I* polymorphism, Venezuela.

Abstract. Among genes implied on the osteoporosis genetics, the most studied gene worldwide is the receptor gene of D vitamin (VDR), through the characterization of *Bsm I* polymorphism. The main objective of this research was to analyze the *Bsm I* polymorphism of the VDR gene in a sample of 133 postmenopausal women distributed in three groups: 54 with osteoporosis, 24 with osteopenia and 55 normal controls for the disease. 28 of the women with osteoporosis presented the BB genotype, which is related in others countries to bone mineral density decrease, 20 had the Bb genotype, and 6 the bb genotype. Of the control group only 11 women presented the BB genotype, 36 showed the heterozygote genotype and 8 the bb genotype. The frequencies of the B and b alleles in the analyzed population were 0.6 and 0.4 respectively. The BB genotype was found in 52% of the group with osteoporosis, and in 20% of the control group, these findings are statistically significant, which suggest an association between the BB genotype and osteoporosis.

Recibido: 13-06-2002. Aceptado: 17-07-2003.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es una enfermedad esquelética y sistémica que se caracteriza por una disminución en la masa ósea y un deterioro en la micro-arquitectura del hueso, lo que conlleva un aumento en la fragilidad ósea y en consecuencia del riesgo a fracturas (1). En muchos países del mundo es la enfermedad ósea metabólica más común y una de las más asociadas al envejecimiento (2).

Los estudios realizados en gemelos han demostrado que los factores genéticos son responsables de más de un 80% de la variabilidad en la densidad mineral ósea (DMO), parámetro considerado como el mejor predictor de OP, observándose que la masa ósea está bajo un fuerte control genético, por lo que se cree que los genes involucrados regulan tanto el pico de masa ósea como la tasa de pérdida de hueso (1-6).

Dentro de estos genes están el del colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1), el receptor de los estrógenos (ESR1), la osteocalcina, las Interleuquinas 1 y 6 y el receptor de la vitamina D (VDR; vitamin D receptor); éste último es el más estudiado y codifica para una hormona importante en la regulación ósea. Todos estos genes forman parte de los genes candidatos a ser determinantes genéticos de la masa ósea (1,7-9).

El gen del VDR está localizado en el cromosoma 12, específicamente en el locus 12q12-12q14; tiene una longitud de 75 Kilo bases (Kb) distribuidos en 11 exones y 10 intrones y en su extremo 3' se han descrito varios polimorfismos de restricción, entre ellos el *Bsm I*. Morrison y col. en el año 1992 (10), fueron los primeros en correlacionar el genotipo BB del polimorfismo *Bsm I* del gen VDR con los niveles de osteocalcina, indicando que los alelos son funcionalmente diferentes, contribuyen a la variabilidad normal

fisiológica de los niveles de osteocalcina y son predictores de la diversidad en el recambio óseo y en consecuencia en la DMO. Otros investigadores han reportado hallazgos similares a los de Morrison y col. mientras que algunos no han encontrado diferencias significativas entre el genotipo BB y la pérdida de masa ósea (3-6, 8, 10-21).

Debido a la alta incidencia de la enfermedad, a su asociación con el envejecimiento y al costo socio-económico de las fracturas originadas por la OP, cobran vital importancia las estrategias encaminadas a la prevención y detección de grupos de alto riesgo. Dentro de estas estrategias se encuentra el análisis de los polimorfismos del gen *VDR*, aplicado en muchos países del mundo para la identificación de mujeres con predisposición genética a la OP (3-6, 8, 10-22). Por tal motivo, se realizó este estudio, en una población de mujeres con OP, con el propósito de analizar y caracterizar el polimorfismo *Bsm I* del gen del *VDR* y determinar si sus alelos pueden considerarse como factores genéticos de susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

PACIENTES Y MÉTODOS

La muestra estuvo constituida por 133 mujeres del municipio Maracaibo, capital del estado Zulia en Venezuela, posmenopáusicas, referidas a la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, previo consentimiento informado y procedentes de diferentes centros de salud de la localidad. La muestra de afectadas con OP estuvo conformada por 54 mujeres con edad promedio de $61,7 \pm 8,3$ años diagnosticadas por estudios de densitometría ósea positiva. Los criterios de inclusión considerados para calificar al grupo de afectadas incluyeron: sexo femenino, posmenopáusica, densitometría ósea positiva para OP, preferiblemente con antecedentes familiares de OP y no presentar enfermedad endocrina ni de tejido co-

nectivo que pudiera ocasionar una OP secundaria. El grupo control estuvo constituido por 55 mujeres normales y 24 con osteopenia, con edad promedio de $53,6 \pm 6,4$ años, con densitometría ósea negativa para OP y preferiblemente sin antecedentes familiares de la enfermedad.

A ambos grupos se les extrajo 5 ml de sangre periférica para aislar y purificar el ADN, empleando de manera combinada los métodos de Fenol-Sevag (23) e inorgánico (24). A partir de 100 ng de ADN y en un volumen de 25 μ L se realizó una amplificación, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, de una región de 825 pb correspondiente al extremo 3' del gen del *VDR* que contiene un polimorfismo de restricción para la enzima *Bsm I*, empleando 10 pmoles de oligómeros cuya secuencia fue descrita por Morrison y col. (11), 200 μ M de dNTP's, 2 mM de $MgCl_2$, 10% de DMS y 2,5 unidades de Taq Polimerasa (Promega). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización prolongada a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, anillado a 55°C y extensión a 72°C, 1 minuto c/u, y una extensión prolongada a 72°C por 10 minutos. Diez μ L de cada producto amplificado se sometieron a digestión empleando la enzima de restricción *Bsm I* (New England Biolabs), a 65°C, durante 2 horas para finalmente caracterizar los productos digeridos a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X y visualizando los fragmentos de restricción con Bromuro de Etidio. La ausencia del sitio de restricción en el producto amplificado se designó como el alelo B y presentó una única banda de 825 pb; la presencia del sitio de restricción se asignó como el alelo b, generando dos fragmentos de restricción: 650 pb + 175 pb. Las heterocigotas para el polimorfismo *Bsm I* se calificaron como Bb y presentaron tres fragmentos: 825 pb, 650 pb + 175 pb.

Para el análisis de los resultados, se utilizó la prueba del ajuste del equilibrio de Hardy Weinberg (HW), a través del estadístico χ^2 y el cálculo del riesgo relativo se llevó a cabo según Ott (25)

RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestra la imagen de un gel de agarosa al 2% con la caracterización del polimorfismo *Bsm I* del gen del VDR. Del total de las muestras, las frecuencias de los alelos "B" y "b", fueron 0,60 y 0,40 respectivamente. En la Tabla I se presentan los genotipos generados por el total de las mujeres menopáusicas estudiadas. Se observa que un 52% correspondió a mujeres con genotipo heterocigoto Bb, seguido por un 33% con genotipo BB y un 15% con genotipo bb.

Cuando se analizó el grupo de mujeres con OP, 52% resultaron homocigotas BB; 37%, heterocigotas Bb y 11% homocigotas bb. Del grupo control normal, 20% resultó

BB, 65% heterocigotas Bb y 15% homocigotas bb. Del grupo de mujeres con osteopenia, 21% resultaron homocigotas BB, 54% heterocigotas Bb y 25% homocigotas bb (Tabla II).

Para determinar la significación estadística de estos hallazgos, sólo fueron comparados el grupo de mujeres con OP con el grupo control normal (Tabla III). La aplicación del estadístico chi cuadrado reveló diferencias significativas entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

La creciente expectativa de vida, principalmente en los países desarrollados, pareciera indicar que los problemas de la OP afectarán notablemente a la mayoría de los individuos en los próximos años, y su trascendencia económica la involucra como un problema de salud pública mundial. Las consecuencias clínicas de la OP son principalmente las fracturas, dentro de las cuales las más comunes son las de columna, muñe-

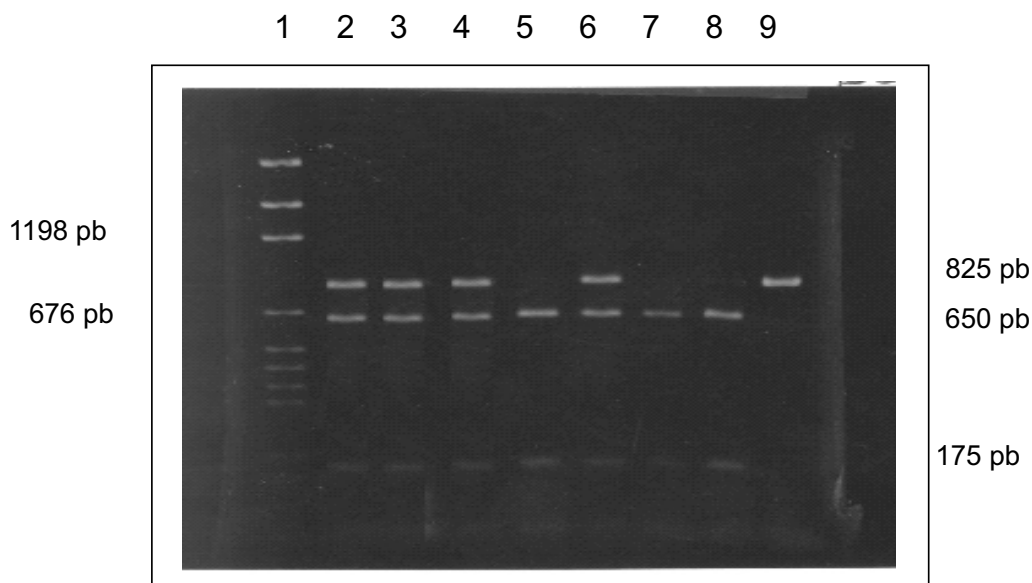


Fig. 1. Fotografía de un gel de agarosa al 2% corrido en electroforesis con buffer TBE 1X mostrando el polimorfismo *Bsm I* del gen del VDR. Línea 1: marcador de Peso Molecular (MPM) Pgem (Promega). Línea 2-4,6: fragmentos correspondientes al genotipo Bb. Línea 5,7,8: genotipo bb. Línea 9: genotipo BB. En el lado izquierdo a la fotografía se indica el tamaño de dos fragmentos del MPM y en el lado derecho se indican los tamaños de los fragmentos del polimorfismo.

TABLA I
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS TOTALES
DEL POLIMORFISMO *Bsm I*

Genotipos	Observados	Esperados	χ^2
BB	44(33%)	47,88	0,31
Bb	69(52%)	63,84	0,41
bb	20(15%)	21,28	0,05
Total	133	133	0,77*

*NS.

ca y cadera, siendo esta última la más grave, tanto para el individuo como para los sistemas de salud. Al costo económico de estas fracturas hay que añadirles el costo social, debido a su asociación con una elevada mortalidad y morbilidad, aunado a la disminución de la esperanza de vida en las mujeres con OP cuando se compara con la población normal.

La asistencia al paciente debe ser llevada a cabo tan tempranamente como sea po-

sible durante la historia natural de la enfermedad, por este motivo cobra especial importancia las estrategias encaminadas a la prevención y a la detección de grupos de alto riesgo (22). Dentro de las estrategias encaminadas a la prevención de la OP, las herramientas de la biología molecular se han convertido en piezas fundamentales para el diagnóstico de los grupos de elevado riesgo. Así, el estudio de los polimorfismos de restricción en el gen *VDR*, se ha aplicado en varias poblaciones para la identificación de mujeres con predisposición genética a sufrir la enfermedad (3-6, 8, 10-21).

Este estudio constituye el primer reporte venezolano sobre asociación genética de polimorfismos de ADN y osteoporosis, realizando el análisis del polimorfismo *Bsm I* del gen *VDR* en una muestra de mujeres posmenopáusicas residentes del estado Zulia, quienes presentaron una frecuencia de 0,52 para el genotipo BB a diferencia del grupo control normal que mostró una

TABLA II
GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO *Bsm I* EN LOS GRUPOS DE MUJERES ESTUDIADAS

Genotipos	Normales	Osteoporóticas	Osteopenia	Total
BB	11(20%)	28(52%)	5(21%)	44
Bb	36(65%)	20(37%)	13(54%)	69
bb	8(15%)	6(11%)	6(25%)	20
Total	55	54	24	133

TABLA III
CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN MUJERES CON OP Y CONTROLES

Muestra analizada	Genotipo	Observados	Esperados	χ^2
Muestra con OP	BB	28	19,32	3,89
Muestra control	BB	11	19,68	3,82
Muestra con OP	Bb	20	27,74	2,15
Muestra control	Bb	36	28,26	2,11
Muestra con OP	bb	6	6,94	0,12
Muestra control	bb	8	7,06	0,12
Total		109	109	12,21*

*p < 0,01.

frecuencia de 0,20. La asociación de este genotipo (BB) con la osteoporosis fue significativa (χ^2 : 12,21, $p < 0,01$). Estos resultados son compatibles con los reportados para otras poblaciones en las que se han aplicado los polimorfismos del gen *VDR* para la identificación de mujeres con predisposición a la OP (3-5, 10,11, 14-16). Así, Gennari y col. (4) reportaron que las mujeres con OP tenían mayor frecuencia del genotipo BB cuando se compararon con el grupo control (0,25 vs 0,0763) y demostraron que las mujeres con genotipo BB tenían menor DMO lumbar que las de genotipo bb. Hallazgos similares fueron reportados en un estudio realizado en mujeres posmenopáusicas japonesas, en el cual se investigó la asociación del polimorfismo *Bsm I* del *VDR* con la pérdida ósea y la DMO, demostrándose que la presencia del alelo B estuvo asociado con pérdida de masa ósea y disminución de la DMO en esa población (15).

En relación a la frecuencia genotípica, en el presente estudio se encontró que el genotipo Bb fue el más frecuente (52%) seguido por el genotipo BB (33%) y el bb (15%). Estos hallazgos son acordes con los reportados en poblaciones de Australia, España, Brasil e Italia en cuanto al genotipo Bb, el cual es el más frecuente aunque el genotipo bb fue el segundo en frecuencia y el BB el menos frecuente. Sin embargo, estudios realizados en Japón, China y México encontraron que el genotipo más frecuente fue el bb, seguido por el Bb y el BB (3, 4, 10-12, 14-19).

Los resultados de este estudio parecen sugerir que en la población estudiada el polimorfismo *Bsm I* del gen *VDR*, está asociado al fenotipo osteoporosis, por lo que podría ser utilizado como una herramienta que permita la detección de grupos de elevado riesgo a desarrollar la enfermedad, en especial para la identificación de mujeres con predisposición genética a desarrollar la

OP. El riesgo relativo de una mujer posmenopáusica de desarrollar OP, teniendo el genotipo BB fue 4,3 veces mayor que si tuviera un genotipo diferente. Un asesoramiento adecuado a la paciente con riesgo de OP que permita modificar hábitos nutricionales, sedentarismo, terapia de sustitución hormonal entre otros, podría minimizar o retardar la aparición de los síntomas de la enfermedad, permitiendo mejorar la calidad de vida a estas pacientes. Debido a la trascendencia de este estudio, es importante la correlación de estos resultados con los hallazgos bioquímicos que permitan confirmar si los resultados genéticos reportados (genotipos del *VDR*) en esta población, son funcionalmente diferentes y se correlacionan con los niveles fisiológicos de la osteocalcina. De igual forma, la realización de adicionales estudios acerca de los genes candidatos distintos al gen *VDR* o de adicionales polimorfismos del gen receptor de la vitamina D, incrementaría el valor de este estudio de la genética de la OP en esta población.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por la subvención de esta investigación según proyecto 1177-00. Así mismo al SMO de LUZ, a las Dras. Argelia Ocando y Ediluz Araujo por la referencia de pacientes.

REFERENCIAS

1. **Giguere Y, Rousseau F.** The genetics of osteoporosis: complexities and difficulties. Clin Genet 2000; 57: 161-169.
2. **Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA.** Genetic factors in bone turnover. J Clin Endocrinol Metab 1991; 72(4):808-813.
3. **Swains J, Van Tornout J, Loro ML, Sayre J, Roe T, Gilsanz V.** Vitamin D receptor gene polymorphism and bone density in

- prepubertal american girls of Mexican descent. *N Engl J Med* 1997; 337(2): 77-82.
4. **Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli E, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi A, Brandi M.** Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):939-944.
 5. **Howard G, Nguyen T, Morrison NA, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, Kelly P.** Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(9): 2800-2805.
 6. **Sosa-Henriquez M, Torres-Ramirez A, Domínguez-Cabrera C, Salido E, Saavedra-Santana P, Barrios Y, Limiñana-Cañal JM, Betancor-Leon P.** Genetic polymorphism of vitamin D receptor and osteoporosis. *Med Clin (Barc)* 1998; 110(17): 646-650.
 7. **Seeman E.** Genetic determinants of the population variance in bone mineral density. In: Rosen CJ, Iowacki JG, Bilizikian, eds. *The Ageing Skeleton*. New York: Academic Press 1999: pp. 77-92.
 8. **Zhao J, Zhou X, Liu G, Meng X, Xing X.** The frequencies of the vitamin D receptor gene alleles in adults of Han nationality in Beijing area. *Zhongguo Yi Xue ke Xue Yuan Xue Bao* 1997; 19(1): 18-23
 9. **Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC.** Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene *BGLAP* and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* 1999; 60(2): 210-217.
 10. **Morrison NA, Yeoman R, Kelly P, Eisman JA.** Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6665-6669.
 11. **Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA.** Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.
 12. **Ramalho AC, Lazareti-Castro M, Hauache O, Kasamatsu T, Brandao C, Reis AF, Takata E, Cafalli F, Tavares F, Gimeno SG, Vieira JG.** Fractures of the proximal femur: correlation with vitamina D receptor gene polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31(7): 921-927.
 13. **Poggi M, Aterini SA, Nicastrò L, Chiarugi V, Ruggiero M, Pacini S, Gulisano M.** Lack of association between body weight, bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphism in normal and osteoporotic women. *Dis Markers* 1999; 15(4): 221-227.
 14. **Bernad M, Jaramillo G, Aguado P, Del Campo T, Coya J, Gijón-Baños J, Saldaña-Barrera H, Martínez ME.** Polymorphism of the gene of vitamin D receptor and bone mineral density in postmenopausal women. *Med Clin (Barc)* 1999; 112(17): 651-655.
 15. **Kikuchi R, Lemur T, Gorai I, Ohno S, Minaguchi H.** Early and late postmenopausal bone loss is associated with *Bsm I* vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int* 1999; 64(2):102-106.
 16. **Murakami F, Hagino H, Shimomura T, Ikawa S, Hirano Y, Iijima K, Yamamoto K.** Association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphism changes in radial bones mineral density with long-term follow-up: longitudinal study. *Rinsho Byori* 1998; 46(8): 766-773.
 17. **Zhang H, Tao G and Wu Q.** Preliminary studies on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis in Chinese women. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1998; 19(1): 12-14.
 18. **Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T, Ogura Y, Takemoto F, Hara S, Yamada A., Kawaguchi Y, Hosoya T.** Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with endstage renal disease. *Kidney Int* 1998; 53(2):454-458.
 19. **Cárdenas-Ibarra L, Jaramillo-Rangel G, Sánchez CN, Montes-Villarreal J, Villarreal-Pérez J, Barrera-Saldaña H.** Diversi-

- dad en el gen receptor de la vitamina D en Mexicanas. *Bioquimia* 1999; 24(3): 59-63.
20. **Ho YV, Briganti EM, Duan Y, Buchanan R, Hall S, Seeman E.** Polymorphism of the vitamin D receptor gene and corticosteroid-related osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999; 9(2):134-138.
21. **Kannus P, Palvanen M, Kaprio J, Parkkari J, Koskenvuo M.** Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of nationwide cohort of elderly Finnish twins. *Br Med J* 1999; 319: 1334-1337.
22. **Panceta J, Talbot J.** Osteoporosis. Editorial Médica Panamericana. 2001. Buenos Aires. Argentina.
23. **Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K.** Preparation of genomic DNA. Phenol extraction and concentration of DNA from aqueous solutions. In: *Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology.* Ed. Greene Publishing associates and Wiley-Interscience. 1989.
24. **Miller A, Dykes D, Polesky H.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):12-15.
25. **Ott J.** Analysis of human genetics linkage. The Johns Hopkins University. Press. Baltimore, USA. 1985.