

ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ I FUNCIONALS EN GENS CANDIDATS PER A L'OSTEOPOROSI

Memòria presentada per

Mariona Bustamante Pineda

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi dirigida per la Dra. Susana Balcells Comas i pel Dr. Daniel Grinberg Vaisman
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
de la Universitat de Barcelona

Dra. Susana Balcells Comas

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Mariona Bustamante Pineda

2007

1. EL TEIXIT OSSI

1.1. DEFINICIÓ I FUNCIONS DEL TEIXIT OSSI

L'os és un teixit connectiu especialitzat que constitueix, junt amb el cartílag, el sistema esquelètic. El teixit ossi desenvolupa una funció mecànica, una funció de protecció dels òrgans vitals i de la medul·la òssia, i una funció metabòlica ja que regula l'homeòstasi del calci i el fòsfor (Kierszenbaum, 2002; Harada i Rodan, 2003).

1.2. TIPUS D'OSSOS

Els ossos es poden classificar en funció de l'anatomia, de la histologia o bé segons el seu procés de desenvolupament.

■Anatòmicament

Anatòmicament hi ha dos tipus d'ossos: els ossos llargs (per ex. el fèmur) i els ossos plans (per ex. el crani) (Kierszenbaum, 2002). En els ossos llargs podem distingir-hi tres parts: dos extrems amples (epífisis), un tub cilíndric central (diàfisi) i la zona d'unió entre ambdues parts anomenada metàfisi (Fig. 1A). La metàfisi delimita la zona on es concentra el creixement de l'os anomenada placa de creixement o placa epifisiària. L'os es troba recobert per una densa capa fibrosa anomenada periosti, on s'insereixen els músculs, els tendons i els lligaments.

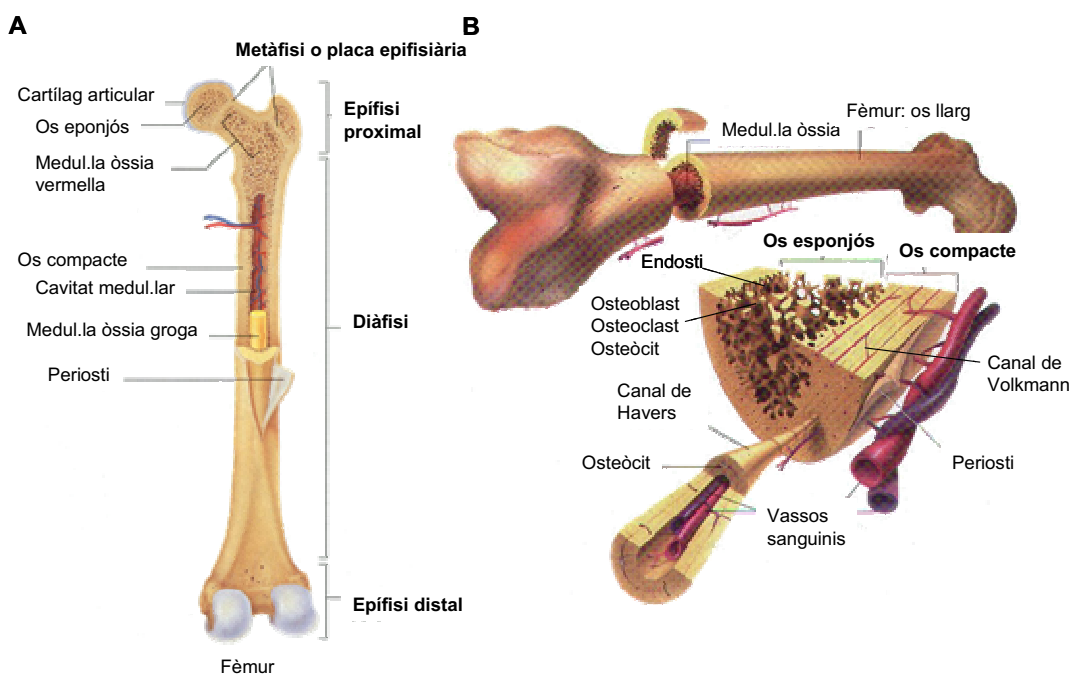


Fig. 1 Tipus d'ossos segons l'anatomia i la histologia. **A.** Parts anatòmiques d'un os llarg. **B.** Histològicament podem distingir l'os esponjós i l'os compacte (extret de <http://www.sirinet.net/~jgjohnso/skeletonorg.html>).

■Histològicament

A nivell histològic podem distingir l'os cortical o compacte, responsable de l'activitat mecànica, i l'os trabecular o esponjós, responsable de les demandes metabòliques (Kierszenbaum, 2002). L'os cortical es troba en les diàfisis dels ossos llargs i en la part externa de tots els ossos del cos. S'estructura en làmines concèntriques al voltant d'uns canals anomenats canals de Havers que s'extenen longitudinalment seguint les línies de tensió a les què l'os està sotmès (Fig. 1B). A través dels canals hi circulen els vasos sanguinis, els vasos limfàtics i el sistema d'innervació de l'os. Aquests canals es connecten entre ells per mitjà dels canals de Volkmann. Entre les làmines concèntriques mineralitzades hi ha uns petits orificis o llacunes on es troben els osteòcits. El canal de Havers junt amb els anells concèntrics, els orificis o llacunes i els osteòcits conformen el sistema de Havers o osteona.

En l'os trabecular, les làmines estan col·locades de manera erràtica formant trabècules amb grans espais on es situa la medul·la òssia vermella. Els vasos sanguinis penetren directament a l'os esponjós. A la superfície de l'os es troben les cèl·lules encarregades de mantenir el teixit ossi: els osteoblasts, els osteoclasts i els osteòcits. L'os trabecular forma les epífisis dels ossos llargs i es troba en l'interior de la majoria dels ossos plans (Fig. 1B).

En adults, el 80% en pes de l'esquelet està format per os cortical. Tot i així la proporció de cada tipus histològic varia segons els ossos: mentre que les vèrtebres estan formades per un 66% d'os trabecular, el fèmur està format per un 75-80% d'os cortical.

■Segons el desenvolupament

Durant el desenvolupament, l'ossificació es duu a terme a través de dos processos: l'ossificació endocondral (Fig. 2A) i l'ossificació intramembranosa (Fig. 2B) (Kierszenbaum, 2002). Els ossos de la base del crani, de la columna vertebral, de la pelvis i de les extremitats s'anomenen ossos cartilaginosa ja que es formen inicialment sobre un model de cartílag que és reemplaçat posteriorment pel teixit ossi a través de l'ossificació endocondral.

Alguns ossos plans del crani i part dels ossos de la mandíbula s'originen a partir de l'ossificació intramembranosa. En aquest cas les cèl·lules mesenquimàtiques (MSC) es diferencien directament cap a cèl·lules osteoblàstiques. L'os es crea per aposició: les cèl·lules sintetitzen matriu òssia que es va dipositant sense orientació i la calcificació és lenta.

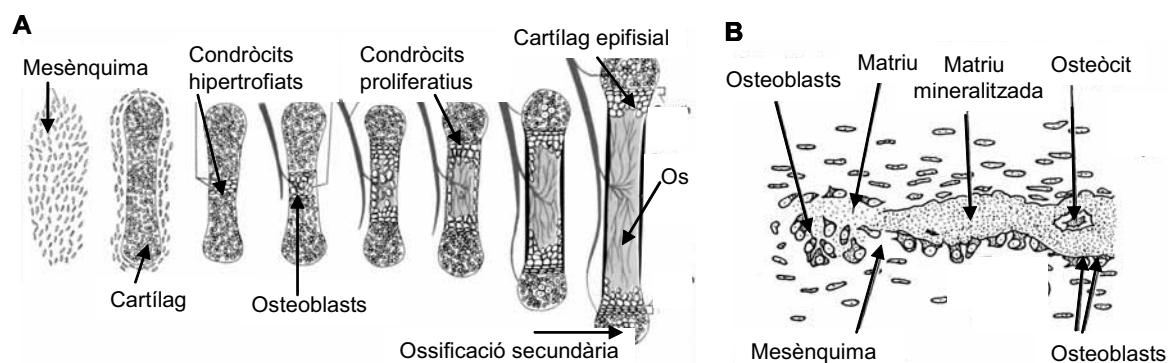


Fig. 2 Tipus d'ossos segons el procés de desenvolupament: endocondral (A) o intramembranós (B) (adaptat de <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci312/Bone/Bonelect.htm>).

1.3. CONSTITUENTS DEL TEIXIT OSSI

1.3.1. Les cèl·lules del teixit ossi

El teixit ossi està format per una matriu extracel·lular mineralitzada i per tres tipus principals de cèl·lules: els osteoblasts, els osteoclasts i els osteòcits (Fig. 3).

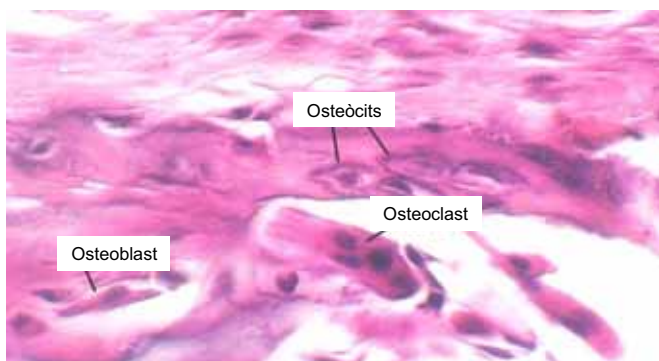


Fig. 3 Tipus cel·lulars principals de l'os. (http://www.cytochemistry.net/micranatomy/bone/Question_14c.htm)

■Els osteoblasts

Els osteoblasts són les cèl·lules encarregades de la formació de la matriu òssia i de la mineralització d'aquesta. Els osteoblasts es troben en les superfícies òssies quan l'os creix, es desenvolupa o es remodela. Es caracteritzen per tenir un citoplasma abundant amb un gran aparell de Golgi degut a l'alta taxa de síntesi de proteïnes que duen a terme (Mackie, 2003).

Els osteoblasts s'originen a partir de cèl·lules progenitores d'origen mesenquimàtic (MSC) (Harada i Rodan, 2003). Aquestes cèl·lules també poden diferenciar-se donant lloc als mioblasts, als condrocits i als adipòcits (Fig. 4). La diferenciació de les cèl·lules mesenquimàtiques cap a la línia osteoblàstica en detriment de la diferenciació cap a altres tipus cel·lulars ve determinada per una combinació de factors de transcripció, factors de creixement i hormones. En aquest procés el factor de transcripció Runx2 és essencial. L'estructura gènica i proteica de *RUNX2* així com la funció que desenvolupa en l'os es comenten a l'apartat *Introducció 4. Gens implicats en l'osteoporosi i estudiats en el present treball*. També intervenen en el procés de diferenciació osteoblàstica les proteïnes morfogèniques de l'os (BMPs), el sistema Wnt/Lrp5/6, el factor de creixement TGF β 1 i certes hormones (la PTH, la vitamina D₃ o els estrògens).

Durant la diferenciació, l'osteoblast produeix una sèrie de proteïnes específiques, els anomenats marcadors osteoblàstics, entre els quals destaquen: el col·lagen de tipus I, l'osteocalcina (OCN), la sialoproteïna (BSP) i la fosfatasa alcalina (ALP) (Kierszenbaum, 2002). Mentre els tres primers marcadors de diferenciació osteoblàstica formen part de la matriu extracel·lular, l'ALP és un ectoenzim que hidrolitza èsters de monofosfat a pH alcalí.

Finalment, els osteoblasts un cop diferenciats poden entrar en apoptosi o bé madurar i donar lloc als osteòcits i a les cèl·lules del revestiment. Aquestes cèl·lules, que són quiescents, juguen un paper metabòlic i tenen la capacitat de revertir a osteoblasts.

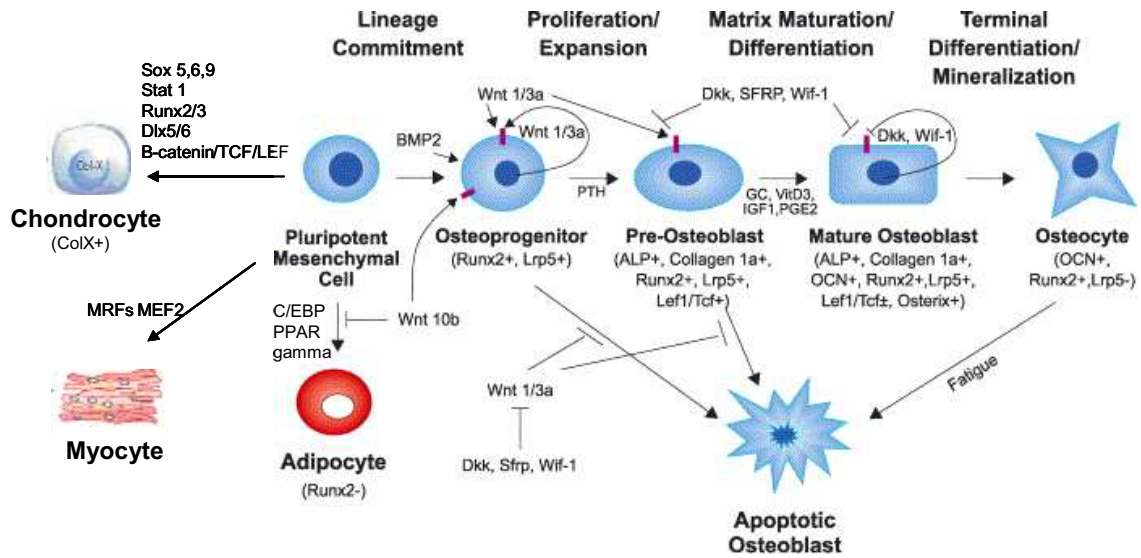


Fig. 4 Control de la diferenciació dels osteoblasts i altres tipus cel·lulars. Els osteoblasts es diferencien a partir de cèl·lules mesenquimàtiques que també poden derivar cap a mioblasts, adipòcits i condrocits. Cada tipus cel·lular disposa de factors de transcripció específics. Runx2 és essencial per a la diferenciació dels osteoblasts, però també intervé en la maduració dels condrocits. En la imatge es mostren els marcadors osteoblàstics presents en cada estadi de la diferenciació (modificat de Westendorf i col., 2004).

■ Els osteoclasts

Els osteoclasts, cèl·lules plurinucleades gegants, són els encarregats de la resorció òssia que té lloc per tal de mantenir la massa òssia i el balanç de calci. Els osteoclasts provenen de la diferenciació de precursors de la línia cel·lular dels monòcits-macròfags (CFU-GM) que circulen en sang perifèrica (Boyle i col., 2003); (Fig. 5).

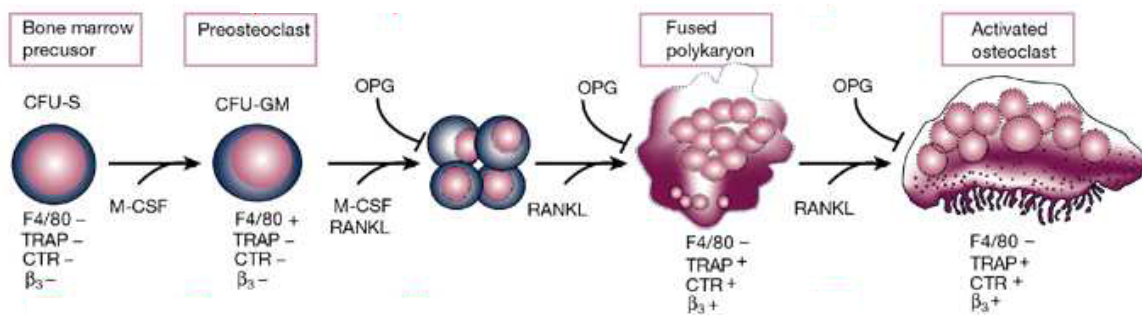


Fig. 5. Procés d'osteoclastogènesi a partir dels monòcits-macròfags (CFU-GM) fins als osteoclasts madurs. En l'esquema es mostren les molècules que intervien regulant la diferenciació així com també els marcadors osteoclàstics (Boyle i col., 2003).

Durant l'osteoclastogènesi les cèl·lules precursors donen lloc als preosteoclasts, els quals es fusionen entre ells i donen una cèl·lula plurinuclear (de 4 a 20 nuclis) que donarà lloc a l'osteoclast. Els factors imprescindibles per a aquest procés són el RANKL (citocina relacionada amb els TNF) i el CSF1 (factor estimador de colònies 1 o M-CSF). L'osteoclast madur s'activa per mitjà de senyals que promouen canvis estructurals del citoesquelet i de l'adhesió cel·lular.

Aquests canvis afavoreixen la formació de compartiments externs que s'acidifiquen a través del complex ATP6i, el canal de clorurs (CICN7) i l'anhidrasa carbònica II (CAII) (Bruzzaniti i Baron, 2006). En aquests compartiments s'exporten enzims com la fosfatasa àcida resistent al tartrat (TRAP), la pro-catepsina K (CATK) i les metaloproteïnases (MMPs) que executen la resorció. Tant els enzims com l'alliberament de protons per part dels osteoclasts tenen com a objectiu dissoldre la matriu mineralitzada. Les restes de la matriu extracel·lular són invaginades per l'osteoclast, i un cop reciclades, es recircularitzen. Els osteoclasts es troben en les llacunes de Howship o resorptives, que són el resultat de la seva pròpia acció.

La diferenciació i la supervivència dels osteoclasts així com l'activació de la funció resorptiva està regulada per hormones (la PTH, els estrògens o la vitamina D₃), citocines (la IL6 o el TNF α) i factors de creixement (el TGF β 1). Però el sistema més important en la regulació dels osteoclasts és el sistema RANK-RANKL-OPG (Boyle i col., 2003); (Fig. 6).

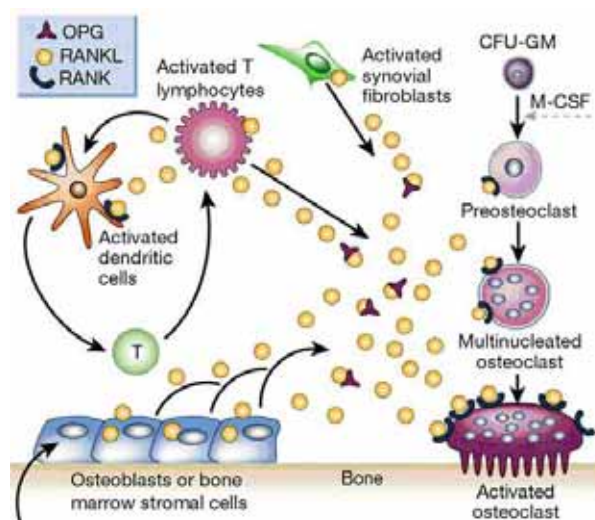


Fig. 6 Control de la diferenciació i de l'activació dels osteoclasts per part del sistema RANK-RANKL-OPG (Boyle i col., 2003).

La proteïna RANKL, que es pot trobar en forma soluble o en forma de membrana, és produïda pels osteoblasts, les cèl·lules T, les cèl·lules dendrítiques i per certs fibroblasts. El RANKL s'uneix al seu receptor de membrana anomenat RANK, expressat pels preosteoclasts i pels osteoclasts. La unió de RANK i RANKL produeix la fusió i diferenciació dels precursors dels osteoclasts i també afavoreix l'increment de l'activitat resorptiva. L'osteoprotegerina (OPG), produïda i secretada pels osteoblasts en forma de dímer, actua segrestant el RANKL i per tant inhibint l'acció osteoclastogènica i resorptiva del sistema RANK-RANKL. L'equilibri entre l'OPG i el RANKL és clau en la determinació de l'estat anabòlic o catabòlic de l'os.

■ Els osteòcits

Els osteòcits, que provenen dels osteoblasts, es troben a l'interior de la matriu òssia (Kierszenbaum, 2002). Són cèl·lules planes, amb poc reticle endoplasmàtic rugós i amb un aparell de Golgi petit. La seva funció consisteix en mantenir la matriu òssia. El destí dels osteòcits és entrar en apoptosi o bé ser absorbits pels osteoclasts juntament amb la resta de la matriu òssia.

1.3.2. La matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular del teixit ossi està formada per fibres de col·lagen i proteïnes no col·làgenes. Juntament amb la matriu del cartílag i la matriu del teixit que forma les dents, té la peculiaritat que es pot calcificar (McKee i Sodek, 2000; Kierszenbaum, 2002).

La fracció orgànica de la matriu extracel·lular del teixit ossi representa un 30-40% del seu pes sec, i la resta, un 60-70%, correspon a les sals minerals que s'hi dipositen. Els components iònics de la matriu òssia són el calci, el fòsfor, el magnesi, els carbonats, els fluorurs, el citrat i els clorurs. El calci i el fosfat cristal·litzen donant lloc a la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que es diposita entre les fibres de col·lagen. L'associació entre la hidroxiapatita i les fibres de col·lagen és la responsable de la duresa i la resistència de l'os.

El principal component orgànic de la matriu òssia és el col·lagen de tipus I que constitueix un 90-95% de la matriu orgànica. La resta està formada per agregats de glicoproteïnes com l'osteocalcina (OCN), l'osteonectina (SPARC), l'osteopontina (OPN) i la sialoproteïna (BSP). Aquestes proteïnes són produïdes pels osteoblasts i les seves concentracions plasmàtiques o les dels seus productes derivats serveixen com a indicadores de la taxa de formació òssia i són usades com a marcadors bioquímics del recanvi ossi.

El col·lagen de tipus I és la proteïna més abundant del cos i el principal component de la matriu extracel·lular del teixit ossi. També es troba present en els tendons, les dents i la pell. El procés de síntesi del col·lagen de tipus I parteix de molècules precursors anomenades pro-col·lagens. Les cadenes $\alpha 1(I)$ i les cadena $\alpha 2(I)$ del pro-col·lagen són sintetitzades a partir dels gens *COL1A1* i *COL1A2*, respectivament (Kierszenbaum, 2002; Michelacci, 2003; Viguet-Carrin i col., 2006); (Fig. 7).

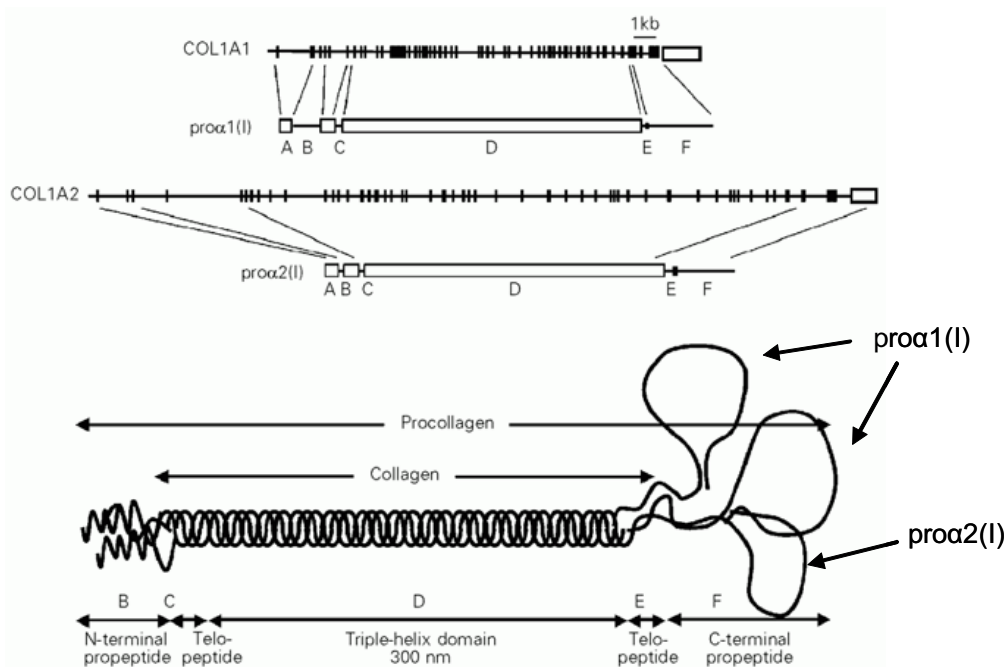


Fig. 7 Estructura del col·lagen madur de tipus I codificat pels gens *COL1A1* i *COL1A2* (Michelacci, 2003).

En el reticle endoplasmàtic certs residus de prolina i lisina de les cadenes del pro-col·lagen s'hidroxi i glicosilen, i així es produeix el triple enrotllament de dues cadenes $\alpha 1(I)$ i una cadena $\alpha 2(I)$ per mitjà de ponts d'hidrogen. A través de l'aparell de Golgi el pro-col·lagen es secreta a l'espai extracel·lular on els seus extrems N-terminal i C-terminal són processats per donar el tropo-col·lagen. Finalment, el tropo-col·lagen s'organitza en feixos formant fibres de col·lagen madur que s'orienten i s'estabilitzen a través de la formació d'enllaços intra i intermoleculars.

Últimament han aparegut una sèrie d'estudis que relacionen l'estructura de la matriu extracel·lular amb els mecanismes de regulació de l'expressió gènica a través d'una xarxa d'intercomunicació on intervien les proteïnes de la matriu extracel·lular, les integrines, el citoesquelet i el nucleoesquelet (Bidwell i col., 2001; Pavalko i col., 2003); (Fig. 8). Aquesta xarxa, anomenada matriu tissular, fa que l'estructura cel·lular s'acabi reflexant en l'estructura dels promotors dels gens: en el grau de superenrotllament i d'inclinació del DNA.

Els mecanismes que comuniquen el citoesquelet amb el nucli no són del tot coneguts, però es creu que les proteïnes de la matriu nuclear hi juguen un paper destacat. Les proteïnes de la matriu nuclear, algunes ubiques i altres específiques de cada tipus cel·lular, contribueixen en l'organització tridimensional del DNA a través de la unió a regions d'anclatge de la matriu (MARs), que són zones riques en adenines i timines (ATs). Algunes de les proteïnes de la matriu nuclear que actuen com a factors arquitectònics en l'osteoblast són els factors de transcripció amb domini *runt*, un d'ells Runx2 (Stein i col., 2004) i les proteïnes de la matriu nuclear, entre elles la CIZ/NMP4 (Alvarez i col., 1997). Tant del col·lagen com de la proteïna CIZ/NMP4 se'n parla amb detall a l'apartat *Introducció 4. Gens implicats en l'osteoporosi i estudiats en el present treball*.

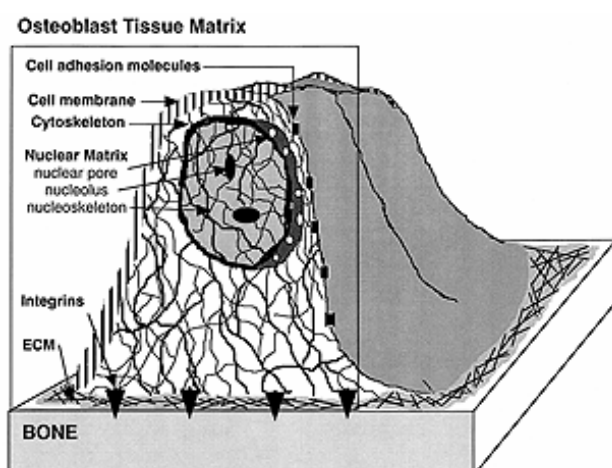


Fig. 8 Matriu tissular dels osteoblasts. En la xarxa intervien la matriu extracel·lular (ECM), les integrines i altres molècules d'adhesió, el citoesquelet i la matriu nuclear (Bidwell i col., 2001).

1.4. EL REMODELATGE OSSI

El remodelatge ossi és el procés cíclic i continu a través del qual l'os vell és destruït i substituït per os nou. Les funcions principals del remodelatge ossi són la renovació de l'esquelet per tal d'assegurar les seves propietats biomecàniques i el manteniment de l'homeòstasi mineral per mitjà de la mobilització del calci i altres ions del reservori esquelètic. En aquest procés intervenen grups discrets de cèl·lules de diversos tipus, que conjuntament formen les anomenades unitats bàsiques multicel·lulars (BMUs) o unitats de remodelatge ossi (BRUs) (Hill, 1998; Prestwood i Raisz, 2000).

Cal destacar que el remodelatge ossi i el modelatge ossi són processos diferents. A diferència del remodelatge ossi, el modelatge ossi no és un procés cíclic, sinó seqüencial que respon a les necessitats de creixement de l'individu i en el qual hi ha un canvi en la distribució espacial del teixit ossi (Robling i col., 2006).

1.4.1. Fases del remodelatge ossi

El remodelatge ossi està àmpliament coordinat en el temps i en l'espai i s'hi poden distingir diferents fases (Hill, 1998; Prestwood i Raisz, 2000); (Fig. 9).

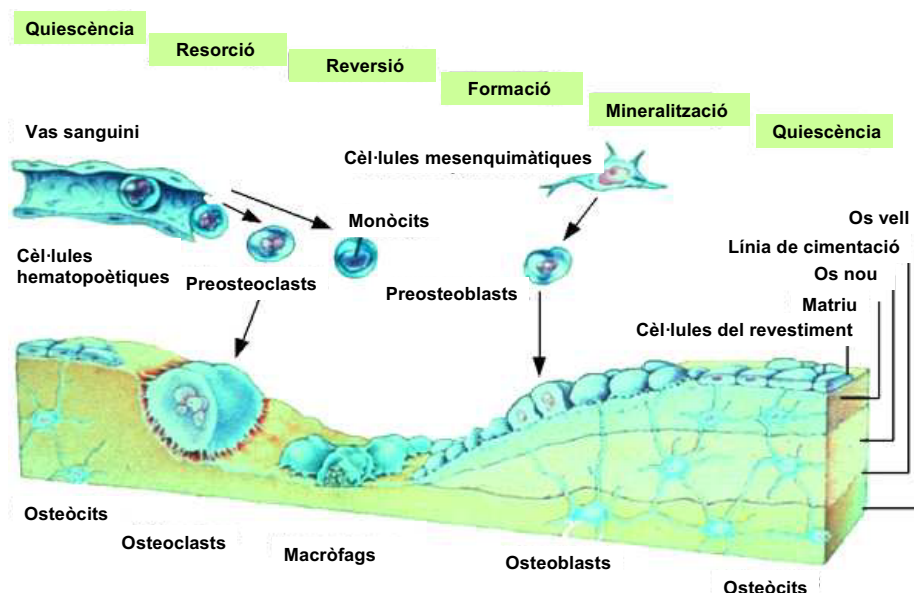


Fig. 9 Fases del remodelatge ossi (extret de <http://www.roche.com/pages/facets/11/ostedefe.htm>)

■ Fase inicial o de quiescència

Els preosteoclasts migren i es fusionen uns amb els altres i s'anclen en les superfícies òssies on tindrà lloc la resorció. Les cèl·lules del revestiment (derivades del llinatge osteoblàstic) són les

encarregades de deixar les superfícies òssies al descobert a través de la seva contracció i l'alliberament d'enzims proteolítics.

■**Fase de resorció**

Els osteoclasts inicien el procés de resorció a través de l'acidificació del medi i de l'alliberament d'enzims. La resorció produeix cavitats irregulars en l'os trabecular, anomenades llacunes de Howship, i túnels cilíndrics en l'os cortical.

■**Fase intermèdia de repòs o de reversió**

Els osteoclasts entren en apoptosi i els macròfags colonitzen la llacuna. Aquests acaben de degradar el col·lagen, depositen proteoglicans per formar una línia de cimentació (substància que cohesionarà l'os vell amb l'os nou) i alliberen factors de creixement, necessaris per diferenciar les cèl·lules mesenquimàtiques cap a osteoblasts.

■**Fase de formació i mineralització**

Els osteoblasts es dipositen sobre la línia de cimentació i comencen a produir una matriu no mineralitzada que posteriorment es mineralitzarà.

En l'os cortical, el temps invertit en un cicle de remodelatge, és d'aproximadament 120 dies: la resorció sol durar 20 dies, l'etapa de reversió uns 10 dies i la de formació uns 90 dies (Robling i col., 2006). La proporció de volum d'os remodelat per unitat de temps es denomina recanvi ossi. La diferència entre el volum d'os format i el volum d'os eliminat, per unitat de temps, s'anomena balanç ossi. El balanç ossi depèn de paràmetres com el nombre de BMUs presents i de la velocitat d'acció d'aquestes (període). Balanços ossis negatius comporten osteoporosi, mentre que balanços positius impliquen osteopetrosi o malalties d'excés ossi (Janssens i Van Hul, 2002; González, 2004b; Robling i col., 2006). Es calcula que cada any es renova el 25% de l'os trabecular i el 4-5% de l'os cortical (Arnett, 2004).

1.4.2. Regulació del remodelatge ossi

El remodelatge ossi està àmpliament regulat a través de factors de diferent origen com són les hormones, els factors de creixement i les citocines. A la Taula 1 es mostra una llista parcial d'alguns dels factors més importants que intervenen en el remodelatge ossi (Hill, 1998). Les hormones calciotrópiques que regulen el metabolisme del calci, les hormones sexuals que tenen un efecte antiresortiu, els factors de creixement tipus TGFβ que estimulen la formació òssia i les citocines de la família IL6 que afavoreixen l'osteoclastogènesi, juguen un paper complex i imprescindible en el remodelatge ossi. D'alguns d'aquests factors se'n parla amb detall a l'apartat *Introducció 4. Gens implicats en l'osteoporosi i estudiats en el present treball*.

Altres mecanismes de regulació del remodelatge ossi són l'estrès mecànic i el sistema nerviós. La falta de pressió mecànica produeix un augment dràstic del recanvi ossi i com a conseqüència una disminució de la massa òssia (Robling i col., 2006). Aquest fet s'observa en individus que resten immobilitzats durant molt temps. En canvi, la formació òssia s'accelera en les regions esquelètiques d'alt estrès mecànic. L'any 2000, Ducy i col·laboradors van proposar per

Introducció

primera vegada que la leptina inhibia la formació òssia mitjançant el sistema nerviós central (SNC). Posteriorment, Takeda i col·laboradors (2002) van demostrar la participació en aquesta regulació del sistema nerviós simpàtic i dels receptors adrenèrgics.

Taula 1 Factors sistèmics i locals que intervenen en el remodelatge ossi (adaptat de Hill, 1998)

Hormones	Calcitriòliques	Hormona paratiroidal (PTH) Vitamina D ₃ (vitD ₃) Calcitonina
	Sexuals	Estrògens Andrògens
	Altres	Glucocorticoides Leptina Insulina Hormona del creixement (GH) Hormona tiroïdal
Factors de creixement	Superfamília TGF β	Factor de creixement transformant beta 1 (TGF β 1) Proteïnes morfogèniques de l'os (BMPs)
	Altres	Factor de creixement insulínic I i II (IGFI) (IGFII) Factor de creixement fibroblàstic (FGF) Factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF)
Citocines	Interleucines	IL1 α i IL1 β IL6 i IL11 IL4, IL10 i IL13
	Altres	Osteoprotegerina (OPG) Lligand del RANK (RANKL) Factor de necrosi tumoral alfa (TNF α)
Factors estimuladors de colònies (CSFs)		Granulòcit-macròfag CSF (CSF- GM) Granulòcit CSF (CSF-G) Macròfag CSF (CSF-M)

2. L'OSTEOPOROSI

2.1. DEFINICIÓ I TIPUS D'OSTEOPOROSIS

2.1.1. Definició

L'osteoporosi és una malaltia generalitzada de l'esquelet, caracteritzada per una massa òssia baixa, alteracions en la microarquitectura de l'os, un augment de la fragilitat d'aquest i conseqüentment un major risc de patir fractures (NIH, 1993). Hom pot considerar l'osteoporosi com una alteració del remodelatge ossi en la qual el recanvi ossi és més gran del normal i el balanç ossi total és negatiu (González, 2004b).

La massa òssia és la quantitat d'os que presenta una persona en un moment determinat. Aquest paràmetre descriu un curs al llarg de la vida (Fig. 10). Augmenta fins aproximadament els 25-35 anys, moment en el qual assoleix el seu màxim valor (pic de massa òssia). El creixement màxim de la massa òssia, però, es situa entre els 12 i 18 anys i qualsevol alteració metabòlica que pertorbi aquest procés repercutirà sobre el valor màxim. El pic de massa òssia és diferent en homes i dones, així com també entre persones del mateix sexe. A partir del pic, la massa òssia va disminuint de manera indolora i asimptomàtica. En les dones durant el primers anys de la menopausa, degut a la disminució dels estrògens, la massa òssia es redueix de manera brusca, però a avançades edats la massa òssia d'homes i dones s'acaba equiparant. En certs individus i a determinada edat la massa òssia sobrepassa un valor anomenat llindar de fractura a partir del qual el risc de patir fractures osteoporòtiques augmenta considerablement (Rosen i Bouxsein, 2006).

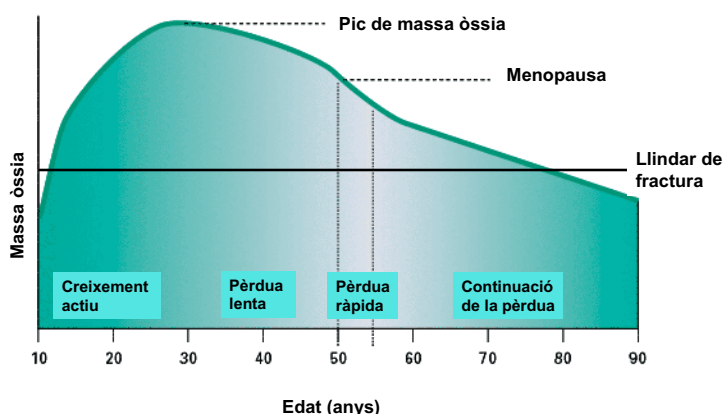


Fig. 10 Corba de la massa òssia en funció de l'edat (imatge procedent de <http://www.merckedicus.com/pp/us/hc/p/diseasemodules/osteoporosis/pathophysiology.jsp>).

El valor de la densitat mineral òssia (DMO), expressat en grams d'os per centímetre quadrat (g/cm^2), serveix per predir l'estat de l'os. La quantificació de la DMO es realitza a través de diverses tècniques densitomètriques indolores i no invasives. La més usada d'aquestes tècniques és l'absorciometria de doble energia (DXA) (del Río, 2004). Aquesta tècnica consisteix en un feix de radiació de baixa energia, la qual disminueix en interaccionar amb la matèria que travessa. La DXA permet mesurar la DMO de la columna entre les vèrtebres lumbars 2 i 4 (L2-L4), la DMO del coll del fèmur o bé la DMO total. Una variació d'aquest mètode, la pDXA serveix per mesurar la

Introducció

DMO del genoll, dels dits i de l'avantbraç. Altres mètodes per mesurar la DMO són la tomografia quantitativa computacional (QCT) i els ultrasons quantitius (QUS).

L'any 1994, l'Organització Mundial de la Salut (OMS), mitjançant l'estandardització dels valors de densitat mineral òssia, va definir les següents categories de diagnosi de l'osteoporosi:

■Osteopènia

Disminució lleugera de la DMO entre 1 i 2,5 desviacions estàndard (DS) respecte la DMO mitjana de la població del mateix sexe adulta jove i sana (*T-score*) (Fig. 11A).

■Osteoporosi

Disminució de la DMO en més de 2,5 DS respecte la mitjana de la població del mateix sexe adulta jove i sana (*T-score*) o en més de 1 DS respecte la mitjana de la població de la mateixa edat i del mateix sexe (*Z-score*).

■Osteoporosi severa

Parlem d'osteoporosi severa quan un individu a més del fet de tenir osteoporosi ha patit una o més fractures osteoporòtiques. Les fractures osteoporòtiques poden afectar qualsevol part de l'esquelet excepte el crani, i són majoritàries les de l'avantbraç distal (fractura de Colles), les de les vèrtebres toràciques i lumbars, i les del fèmur proximal (fractura de cadera) (Fig. 11B). La predisposició a patir fractures és coneguda amb el nom de fragilitat òssia.

Els criteris de diagnosi de l'osteoporosi proposats per l'OMS van ser dissenyats basant-se en la població de dones blanques postmenopàusiques, i per tant s'han d'aplicar amb precaució en altres poblacions.

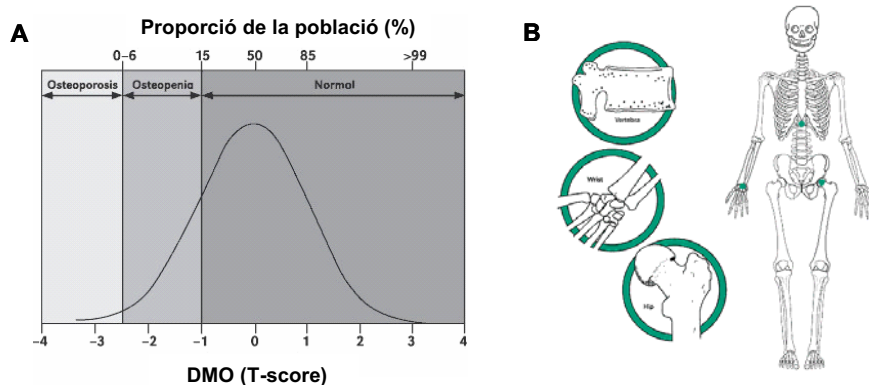


Fig. 11 Definició d'osteoporosi i tipus de fractures. **A.** Representació de la definició d'osteoporosi i osteopènia segons l'OMS. **B.** Principals fractures que es presenten en població osteoporòtica: fractura de vèrtebres, fractura de Colles i fractura de cadera.

(<http://www.merckmedicus.com/pp/us/hcp/diseasemodules/osteoporosis/pathophysiology.jsp>)

Taula 2 Valors del pic de massa òssia (g/cm^2) en diferents sectors anatòmics determinats per DXA en població espanyola jove i sana (adaptat de Diaz Curiel i col., 1997)

Sector	Homes	Dones
L2-L4	$1,030 \pm 0,125$	$1,033 \pm 0,106$
Coll del fèmur	$0,927 \pm 0,124$	$0,840 \pm 0,109$
Total	$1,031 \pm 0,142$	$0,919 \pm 0,097$

Les mitjanes de DMO en diferents regions esquelètiques en població jove i sana espanyola, tant masculina com femenina, es mostren a la Taula 2 (Diaz Curiel i col., 1997).

2.1.2. Tipus d'osteoporosis

En funció del motiu i del moment en què es produeix la pèrdua de massa òssia associada a l'osteoporosi, podem classificar aquesta darrera en (González, 2004b):

■Osteoporosi primària

L'osteoporosi primària, a la qual ens referim quan no especifiquem res més, és el tipus d'osteoporosi més freqüent. Tot i que formen part d'un sol procés i que no es donen de manera totalment separada, a nivell clínic podem distingir dos subtipus d'osteoporosi primària:

■Osteoporosi primària de tipus I o postmenopàusica

Es presenta en les dones durant els cinc primers anys després de la menopausa. Apareix com a conseqüència de la davallada dels nivells d'estrògens i comporta un augment del remodelatge ossi afavorint la resorció, sobretot de l'os trabecular. És una pèrdua d'os ràpida i la fractura més comuna és la de vèrtebres.

■Osteoporosi primària de tipus II o senil

Es presenta tant en homes com en dones i és deguda als canvis hormonals i metabòlics que es produeixen amb l'edat. Entre aquests canvis cal destacar la disminució d'estrògens (lenta en els homes) i l'augment de la PTH. Aquesta hormona incrementa per tal de compensar la disminució tant de la reabsorció del calci renal com de l'absorció de calci en l'intestí deguda a l'edat. L'osteoporosi de tipus II cursa amb una disminució lenta del teixit ossi trabecular i cortical. La fractura més comuna és la de cadera.

■Osteoporosi secundària

L'osteoporosi secundària és causada per malalties endocrines, reumàtiques, hematològiques o hepàtiques com per exemple l'artritis reumatoide, la diabetis de tipus I, estats que bloquegen l'absorció intestinal del calci, l'anorexia nerviosa o l'hiperparatiroidisme. També pot ser causada per l'administració d'alguns fàrmacs com els glucocorticoides i per estadis prolongats de repòs.

2.2. EPIDEMIOLOGIA I FACTORS DE RISC

2.2.1. Epidemiologia

La prevalença de l'osteoporosi, nombre de persones afectades en un període de temps concret en relació al nombre total d'habitants d'una població, és difícil d'establir. Tot i això, s'ha calculat que en aquests moments l'osteoporosi afecta 75 milions de persones a Europa, Estats Units i Japó (OIF). Un 15-30% de les dones i un 8% dels homes caucàsics majors de 50 anys tenen osteoporosi. La xifra augmenta fins al 50% en les dones majors de 70 anys.

Un 30-50% de les dones i un 15-30% dels homes patiran una fractura osteoporòtica al llarg de la vida. S'estima que cada any a Europa 179.000 homes i 611.000 dones pateixen fractures de cadera i que el cost hospitalari derivat de l'atenció d'aquestes arriba als 25 bilions

d'euros. La mortalitat per fractura de cadera passat el primer any s'estima en el 20% (González, 2004a).

S'ha calculat que a Espanya hi ha 3,5 milions de persones amb osteoporosi, principalment dones (2 milions) i cada any es produeixen més de 60.000 fractures de cadera entre aquest col·lectiu. Bona part de les fractures requereixen d'hospitalització i comporten una disminució de la qualitat de vida. A Espanya el cost d'hospitalització derivat de les fractures osteoporòtiques de cadera va ser de 220 milions d'euros l'any 2000 (Alvarez, 2002).

Degut a l'envelliment de la població en els països rics, l'osteoporosi és un problema sanitari de gran magnitud.

2.2.2. Factors de risc

Els factors de risc són aquelles variables que afavoreixen l'aparició de l'osteoporosi i augmenten el risc de patir fractures osteoporòtiques. Seguidament es descriuen els principals factors de risc (Tecnociencia; Hernández, 2004).

■L'edat és un dels factors de risc més importants per a l'osteoporosi. A avançades edats, superiors als 75 anys, la fracció d'homes i de dones amb osteoporosi tendeix a igualar-se. S'ha calculat que en el període dels 45 als 85 anys, per cada 10 anys transcorreguts el risc de patir una fractura osteoporòtica es multiplica per 8 en les dones i per 5 en els homes.

■El sexe és un fort determinant de l'osteoporosi ja que modula tant l'adquisició del pic de massa òssia com la pèrdua d'aquesta durant la menopausa. La privació estrogènica (natural o quirúrgica) suposa una pèrdua accelerada d'os. En general, a edat de menopausa menor o edat de menarquia major, existeix un major risc d'osteoporosi (Guo i col., 2005).

■L'osteoporosi és més prevalent en població blanca i asiàtica que en població negra.

■En general el pes o l'índex de massa corporal (IMC) s'ha correlacionat positivament amb la DMO. La pèrdua brusca de pes també ha estat relacionada amb disminucions de la massa òssia (Reid, 2002). Recentment, però, alguns estudis han qüestionat aquesta relació (Rosen i Bouxsein, 2006).

■La dieta és fonamental per mantenir la massa òssia. La ingesta adequada de calci i de vitamina D₃ frena l'aparició de l'osteoporosi ja que afavoreix l'augment de la massa òssia durant l'etapa de creixement i alhora n'alenteix la pèrdua.

■La ingesta d'alcohol o el consum de tabac actuen com a factors de risc per a l'osteoporosi.

■L'exercici físic actua com a protector en front de la pèrdua de massa òssia. L'exercici, però, més eficaç, és aquell realitzat durant la fase de creixement.

■Factors que augmenten el risc de patir caigudes, com són els problemes visuals o la demència, afavoreixen el risc de patir fractures osteoporòtiques.

■Antecedents familiars d'osteoporosi o de fractura osteoporòtica impliquen un major risc de desenvolupar la malaltia. Això és degut a que l'osteoporosi és una malaltia amb una alta càrrega genètica (veure apartat *Introducció 3. Estudi genètic de l'osteoporosi*).

2.3. PREVENCIÓ I TRACTAMENT

2.3.1. Prevenció

El millor tractament per a l'osteoporosi és la seva prevenció. La prevenció va encaminada tant a l'assoliment d'un elevat pic de massa òssia com a l'intent de reduir la pèrdua a mesura que els individus es fan grans. Per tal d'aconseguir un bon pic de massa òssia, cal promoure l'exercici físic regular i uns hàbits alimentaris adequats. La prevenció de l'osteoporosi també es basa en una bona diagnosi i seguiment. Com que la menopausa és un factor de risc, a les dones perimenopàusiques se'ls realitza una densitometria rutinària i periòdica (Orozco, 2001).

2.3.2. Tractament

En cas que la densitometria, l'història familiar i altres factors ho indiquin oportú, es recepten fàrmacs per alentir la pèrdua de massa òssia (tractaments antiresortius) o bé per augmentar-la (tractaments anabòlics) (Orozco, 2001).

■ Tractaments antiresortius

Entre els tractaments antiresortius destaquen la teràpia hormonal substitutòria (TSH), els moduladors selectius dels receptors d'estrògens (SERMs), la calcitonina, els bifosfonats i la vitamina D₃.

L'administració d'estrògens (TSH) està encaminada a reduir la pèrdua de massa òssia, i alhora solucionar molèsties derivades de la menopausa. Aquest tractament s'administra a dones amb baixa DMO i que han tingut la menopausa recentment. Cal tenir en compte, però, que la TSH comporta una sèrie d'efectes adversos com són l'augment de la probabilitat de patir càncer de pit i d'endometri. Per tal de pal·liar els efectes adversos de la TSH s'han desenvolupat una sèrie de molècules sintètiques que emulen l'efecte dels estrògens (SERMs) unint-se específicament al receptor estrogènic d'os.

La calcitonina, la qual és pot administrar farmacològicament, és una hormona sintetitzada per la glàndula tiroïdal que inhibeix l'activitat osteoclàstica. La vitamina D₃ augmenta l'absorció de calci, fet que afavoreix la mineralització de l'os. La vitamina D₃ i els seus anàlegs s'administren acompanyats de suplementes de calci.

Els bifosfonats, a més d'inhibir la resorció, a llarg termini augmenten la mineralització i la duresa òssia i per tant disminueixen el risc de fracturació. Aquests fàrmacs són recomanables tant per tractar l'osteoporosi primària com l'osteoporosi secundària.

■ Tractaments anabòlics

L'hormona paratiroïdal (PTH), tot i que té un efecte bifàsic en l'os, és l'únic tractament en ús convencional encaminat a augmentar la formació d'os. A elevades concentracions, inhibeix la

Introducció

formació òssia, mentre que en petites dosis i administrada intermitentment és un fort agent anabòlic.

3. ESTUDI GENÈTIC DE L'OSTEOPOROSI

Les malalties monogèniques, les quals tenen una prevalença molt baixa en la població, segueixen un patró d'herència mendelià simple. Per contra les malalties comunes solen presentar un tipus d'herència complexa.

Tot i que existeixen formes d'osteoporosi d'herència medeliana simple, com pot ser l'osteoporosi deguda a mutacions en el gen *ESR1*, l'osteoporosi primària, tant postmenopàusica com senil, és una malaltia d'etiologia complexa determinada tant per factors genètics com per factors ambientals (veure l'apartat *Introducció 2.2.2. Factors de risc*).

L'epidemiologia genètica és la branca de l'epidemiologia que estudia el component genètic de les malalties complexes. En l'estudi genètic d'una malaltia complexa es solen seguir els passos descrits en la Figura 12 (Burton i col., 2005). En primer lloc, i sense necessitat de genotipatge, s'estableix el component genètic de la malaltia, s'estima l'heretabilitat i se n'analitza la segregació. Un cop es disposa d'aquesta informació, a través del genotipatge d'una sèrie de marcadors polimòrfics es duen a terme estudis de lligament i d'associació. Els primers van encaminats a identificar *loci* responsables de la malaltia i els segons busquen les variants últimes causants de la malaltia. Finalment, es poden realitzar estudis funcionals encaminats, generalment, a validar els resultats obtinguts prèviament.

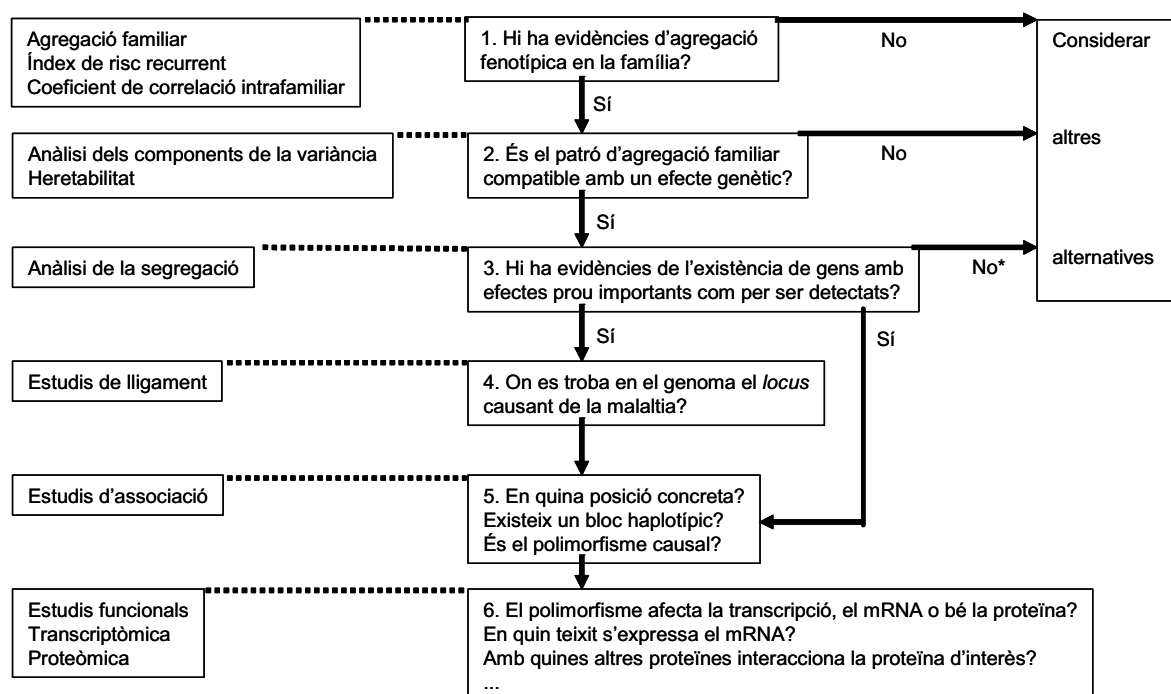


Fig. 12 Aproximació sistemàtica a la identificació i caracterització dels factors genètics de les malalties complexes (modificat de Burton i col., 2005).

*Tot i que a través de l'anàlisi de la segregació no s'obtingui informació que evidenciï l'existència d'un gen major, aquest fet no és suficient per no prosseguir amb els estudis de lligament, d'associació i/o funcionals.

3.1. ESTUDI DEL COMPONENT GENÈTIC: L'HERETABILITAT

Per estudiar el component genètic de les malalties complexes s'analitza l'agregació familiar, l'heretabilitat i la segregació.

L'agregació familiar és un paràmetre que permet establir si existeix una major freqüència d'un determinat fenotip en els parents propers a un individu afecte respecte els parents propers d'un individu no afecte (Burton i col., 2005). Pels trets fenotípics binaris es calcula l'índex de risc recurrent (λ_R), que és la proporció entre la prevalença de la malaltia en parents d'un individu afecte i la prevalença de la malaltia en població general. Pels trets quantitius s'usa el coeficient de correlació intrafamiliar (ICC).

Per determinar si l'agregació fenotípica observada en una família té una base genètica, es necessiten models que relacionin el fenotip, amb l'efecte d'un o més gens, amb l'efecte de factors ambientals, i amb les interrelacions entre ells. Aquests models s'obtenen per mitjà de l'anàlisi dels components de la variància que permet estimar l'heretabilitat (Burton i col., 2005).

Els caràcters complexes, que poden ser quantitius o discrets (els primers es poden convertir en els segons a través d'una funció de susceptibilitat), es poden descriure en termes mendelians si considerem que són poligènics, és a dir, determinats simultàniament per molts *loci*, anomenats QTLs (*quantitative trait loci*).

Els QTs es troben en la població seguint una distribució normal que està definida per dos paràmetres: la mitjana i la variància. La variància total d'un fenotip complex (V_P) és la suma de la variància ambiental (V_E) i la variància genètica (V_G), la qual pot ser desglossada en la variància dels efectes genètics additius (V_A), la variància dels efectes genètics dominants (V_G) i la variància deguda a l'epístasi (V_I). Alhora, la variància ambiental pot ser dividida en la variància deguda a efectes ambientals coneguts i a efectes no coneguts.

L'heretabilitat (h^2) d'un tret fenotípic, entesa d'una manera àmplia, és la proporció de la variància fenotípica total que és deguda als efectes genètics (V_G / V_P) i entesa de manera més restringida és la proporció de la variància total deguda només als efectes genètics additius (V_A / V_P) (Rogers i col., 1999; Strachan i Read, 2005). L'heretabilitat oscil·la entre 0 i 1, on 1 indica que tota la variància fenotípica és deguda a l'efecte dels gens. El valor de l'heretabilitat no és un valor absolut, sinó relatiu que depèn de la població i del moment en el qual s'ha fet l'estudi. És a dir, si un tret fenotípic està determinat per un al·lel pel qual tots els membres de l'estudi són homozigots, aquest *locus* no contribuirà en l'estima de l'heretabilitat. A la pràctica el càlcul de l'heretabilitat es pot fer a partir d'estudis de bessons monozigòtics i dizigòtics o de grups de parentiu de primer ordre com parelles de germans o pares i fills.

L'anàlisi de la segregació és la metodologia estadística utilitzada per determinar, a partir de dades de famílies, el model d'herència no mendelià d'un fenotip particular, i es centra especialment en establir el nombre i la magnitud dels efectes dels gens (Burton i col., 2005; Strachan i Read, 2005). Aquests estudis donen informació sobre la possibilitat de trobar gens de susceptibilitat majors per a una determinada malaltia i per tant informació que justifiqui o no prosseguir amb altres tipus d'estudis.

3.1.1. L'heretabilitat de fenotips relacionats amb l'osteoporosi

Els estudis d'agregació familiar indiquen que, tot i que el risc recurrent per a l'osteoporosi pot ser elevat en parents de primer orde, disminueix dràsticament en parents més llunyans (revisat per Brown, 2005). El risc recurrent entre germans per a l'osteoporosi s'ha calculat en 2,6 (Feng i col., 2005).

Els estudis d'heretabilitat han revelat que entre un 0,4-0,9 de la variància de la DMO és causada per factors genètics (revisat per Nguyen i col., 2000; Huang i col., 2003a; Ralston i de Crombrughe, 2006). S'ha vist que l'adquisició del pic de massa òssia té un fort component genètic, però existeix certa controvèrsia sobre la participació de factors genètics en la pèrdua de massa òssia (Ralston i de Crombrughe, 2006). L'heretabilitat de la DMO depèn del gènere, de l'ètnia i de les regions esquelètiques. Un estudi recent fet en població xinesa, va mostrar que l'heretabilitat de la DMO era de 0,3-0,39 (en dones) i de 0,46-0,83 (en homes) (Ng i col., 2006). En aquest mateix estudi es va observar que la proporció de la variància total fenotípica de la DMO explicada per l'edat era superior en dones que en homes. Pel que fa a la regió esquelètica se sap que la DMO de columna (os trabecular) té un component genètic de més magnitud que la DMO de fèmur (os cortical) (Nguyen i col., 2000). Aproximadament només 1/3 dels gens que influencien la DMO lumbar també influencien la DMO femoral (Huang i col., 2003a). També s'ha observat una sobreposició (10-20%) entre el component genètic que determina l'índex de massa corporal (IMC) i el component genètic que determina la DMO, en especial la de fèmur (Deng i col., 2006; Ng i col., 2006).

Fenotips com els marcadors del remodelatge ossi, les mesures de la qualitat òssia o la mida dels ossos també presenten heretabilitats relativament altes (Nguyen i col., 2000; Huang i col., 2003a; Ng i col., 2006). Diversos estudis han permès estimar l'heretabilitat de patir una fractura osteoporòtica en 0,25-0,54 (Huang i Kung, 2006; Ralston i de Crombrughe, 2006). La susceptibilitat a patir una fractura osteoporòtica depèn del tipus de fractura i de l'edat (Michaelsson i col., 2005). L'heretabilitat de patir una fractura a qualsevol regió esquelètica ajustada per l'edat s'estima en 0,27 (0,09-0,28), mentre que l'heretabilitat específica a patir una fractura de cadera s'estima en 0,48 (0,28-0,57). S'ha observat que la DMO i la fractura osteoporòtica comparteixen pocs components genètics, és a dir, són fenotips determinats per diferents conjunts de gens (Huang i Kung, 2006).

Les anàlisis de segregació realitzades en relació a l'osteoporosi semblen apuntar que la DMO i la susceptibilitat a patir fractures estan determinades per molts *loci*, pocs amb un gran efecte i la majoria amb efectes menors (Nguyen i col., 2000; Brown, 2005; Ralston i de Crombrughe, 2006).

La densitat mineral òssia (DMO) és, doncs, un tret quantitatiu determinat per diversos QTLs i per factors ambientals, i l'osteoporosi, és un tret complex discret que prové d'una funció de susceptibilitat definida a partir de la DMO.

3.2. ESTUDIS DE LLIGAMENT

Els estudis de lligament genètic es realitzen per tal d'identificar els *loci* on es troben els gens de predisposició a una malaltia o fenotip. Existeixen dos tipus d'estudis de lligament: el paramètric (que s'aplica en malalties monogèniques) i el no paramètric (que s'aplica en malalties complexes) (revisat per Rogers i col., 1999; Dawn Teare i Barrett, 2005; Strachan i Read, 2005).

El lligament paramètric consisteix en l'anàlisi de la cosegregació de marcadors genètics i del fenotip d'interès al llarg de diverses generacions d'un pedigrí. Els *loci* que es troben propers al *locus* causant de la malaltia cosegreguen, és a dir, s'hereten junts a la següent generació més sovint que els *loci* que estan més allunyats. Els *loci* que segreguen junts es diu que estan lligats. L'herència conjunta de dos *loci* depèn de la distància que hi ha entre ells, ja que a més distància més probabilitat de recombinació meiótica. El LOD score és la mesura obtinguda en els estudis de lligament i és funció de la probabilitat de recombinació meiótica entre dos *loci* (el marcador i el causant del fenotip). Per conveni, LOD scores per sobre de 3 indiquen lligament, mentre que LOD scores per sota de -2 indiquen exclusió de lligament. Els marcadors genètics que s'utilitzen majoritàriament en els estudis de lligament són els microsatèl·lits. Les repeticions en tàndem de 2-5 parelles de bases són altament polimòrfiques i estan distribuïdes al llarg del genoma de manera més o menys homogènia. Els estudis de lligament duen a la identificació de regions cromosòmiques de certa grandària. En aquest tipus d'estudis s'han d'especificar paràmetres com el patró d'herència i la prevalença de la malaltia.

Per a les malalties multifactorials, on no hi ha un model d'herència clar, s'ha desenvolupat una modalitat dels estudis de lligament anomenada lligament no paramètric. En aquest tipus d'estudis és important distingir els conceptes de IBD i IBS. Dos al·lells situats en un *locus* són idèntics per descendència (IBD) quan han estat heretats d'un mateix ancestre, és a dir, són còpies del mateix al·lel parental. En canvi dos al·lells d'un mateix *locus* són idèntics per estat (IBS) quan, tot i ser iguals, no sabem del cert si deriven del mateix ancestre. El lligament no paramètric es basa en el fet que individus afectes emparentats comparteixen més haplotips idèntics per descendència (IBDs) en la regió gènica causant de la malaltia dels que s'esperaria que compartissin per atzar. Els estudis de lligament no paramètric es poden dur a terme amb parelles de germans afectes o amb grups de parentiu majors. En els estudis de germans afectes, i d'acord amb la hipòtesi nul·la, el nombre d'al·lells IBD compartits pot ser 0, 1 o 2 amb les següents probabilitats: 0,25, 0,5 i 0,25. Si uns determinats al·lells IBD són compartits entre germans afectes significativament més vegades que per atzar diem que hi ha lligament entre aquests al·lells i la malaltia. Aquesta mateixa assumpció pot ser estesa a pedigrís.

3.2.1. Estudis de lligament amb fenotips relacionats amb l'osteoporosi

Gràcies als estudis de lligament al llarg del genoma s'han identificat diversos *loci* lligats a fenotips relacionats amb l'osteoporosi, però només alguns han estat identificats simultàniament en

diversos estudis independents, aquests es mostren a la Taula 3 (revisat per Huang i col., 2003a; Huang i Kung, 2006). Tot i que la majoria d'estudis de lligament s'han realitzat genotipant microsatèl·lits localitzats al llarg del genoma, alguns s'han realitzat en regions cromosòmiques on es troben gens candidats funcionals com els gens *PTHR1*, *ESR1*, *COL1A1* i *IL6*.

Taula 3 Estudis de lligament al llarg del genoma amb fenotips relacionats amb l'osteoporosi (Huang i Kung, 2006)

<i>Població</i>	<i>Localització</i>	<i>Marcador</i>	<i>LOD</i>	<i>Referència</i>	<i>Rèplica</i>	<i>Població</i>	<i>LOD</i>
Caucàsica	1p36	D1S450	2,3	Devoto i col. 1998	Devoto i col. 2001	Caucàsica	3,5
					Wilxon i col. 2003	Europea	2,4
					Devoto et al. 2005	Caucàsica	2,9
Blancs i negres	1q21-23	D1S484	3,6	Koller i col. 2000	Econs i col. 2004	Blancs i negres	4,3
					Ralston i col. 2005	Europea	1,1
					Devoto i col. 2005	Caucàsica	1,7
Caucàsica	2p23-24	D2S149	2,3	Devoto i col. 1998	Niu i col. 1999	Xinesa	2,2
					Kammerer i col. 2003	Mexicans-Americans	4,0
					Peacock i col. 2005	Blancs i negres	3,7
Europea	3p21-24	D3S1298	2,7	Wilson i col. 2003	Kammerer i col. 2003	Mexicans-Americans	1,8
					Ralston i col. 2005	Europea	1,1
					Duncan i col. 1999	Europea	2,7
Caucàsica	4q32-34	D4S413	3,1	Deng i col. 2002	Devoto et al. 1998	Caucàsica	2,5
					Shen i col. 2004	Caucàsica	2,1
					Karasik i col. 2002	Caucàsica	2,1
Europea	4q25	D4S406	2,2	Ralston i col. 2005	Wilson i col. 2003	Regne Unit	1,7
Caucàsica	6p11	D6S2427	2,9	Karasik i col. 2002	Koller i col. 2000	Blancs i negres	2,1
					Styrkarsdottir i col. 2003	Islàndia	2,1
Caucàsica	7p14-15	D7S691	2,6	Shen i col. 2004	Ralston i col. 2005	Europea	2,3
					Kammerer i col. 2003	Mexicans-Americans	1,8
					Devoto i col. 2005	Caucàsica	2,2
Caucàsica	11q14-23	D11S908	3,1	Shen i col. 2004	Devoto et al. 1998	Caucàsica	2,1
					Koller i col. 2000	Blancs i negres	2,0
					Peacock i col. 2004	Blancs i negres	2,5
Caucàsica	12q23-24	D12S1723	3,0	Deng i col. 2002	Karasik i col. 2002	Caucàsica	2,1
					Kammerer i col. 2003	Mexicans-Americans	2,4
					Devoto i col. 2005	Caucàsica	1,6
Mexicans-Americans	13q31-34	D13S800	3,5	Kammerer i col. 2003	Deng i col. 2002	Caucàsica	2,4
					Niu i col. 1999	Xinesa	1,7
Islàndia	20p12	D20S905	5,1	Styrkarsdottir i col. 2003	Shen i col. 2004	Caucàsica	3,1

Altres *loci* han estat identificats en estudis de lligament en famílies amb membres afectats per malalties monogèniques o amb membres que presentaven fenotips extrems relacionats amb l'os (Huang i col., 2003a). Entre aquests hi ha el *locus* 11q12-13 (on es troben els gens *LRP5* i *TCIRG1*) i el *locus* 18q21-23 (on es troba el gen *RANK*). Diferents mutacions en el gen *LRP5* han

estat trobades en individus que manifesten la síndrome de l'osteoporosi pseudoglioma (OPPG) o el fenotip d'alta massa òssia (HBM). El *locus* on es troba el gen *TCIRG1* es va trobar lligat a l'osteopetrosi autosòmica recessiva (arOP). Per la seva banda, la regió cromosòmica on hi ha el gen *RANK* es va trobar lligada a l'osteòlisi expansiva familiar (FEO) i a la malaltia de Paget.

Com hem comentat anteriorment, hi ha evidències que els *loci* que participen en la determinació de la DMO depenen del sexe, de la regió esquelètica, de l'edat i de l'ètnia. Alguns autors han tingut en compte aquestes variables i han subdividit la mostra analitzada en grups homogenis, fet que els ha permès identificar *loci*, l'efecte dels quals quedava diluït en analitzar la totalitat de la mostra (Ralston i col., 2005).

L'anàlisi conjunt de dades procedents de diferents grups d'investigació (metaanàlisi) permet augmentar la potència estadística i així detectar *loci* que tinguin un efecte petit sobre el fenotip. Malgrat això els *loci* identificats en diferents metaanàlisis no sempre són coincidents. Lee i col·laboradors (2005) van realitzar una metaanàlisi de lligament amb els resultats d'onze estudis previs i van trobar lligats a la DMO els següents *loci*: 1pter-1p36.22, 3p22.2-3p14.1, 6p21.1-6q15, 10p14-10q11.21, 16pter-16p12.3, 18pter-18p11.23, 18p11.23-18q12.2, 20pter-20p12.3 i 22q12.3-22pter. Un estudi similar va ser realitzat per Ioannidis i col·laboradors (2007). En ell es va observar lligament entre la DMO lumbar i els *loci* 1p13.3-q23.3, 12q24.31-qter, 3p25.3-p22.1, 11p12-q13.3, 1q32-q42.3 i 18p11-q12.3. Pel que fa a la DMO femoral es van trobar lligats els *loci* 9q31.1-q33.3, 17p12-q21.33, 14q13.1-q24.1, 9q21.32-q31.1 i 5q14.3-q23.2. En aquest estudi es va confirmar que els *loci* que regulen la DMO en homes i dones i en diverses regions esquelètiques no són els mateixos.

Finalment, alguns *loci* han estat identificats per mitjà d'estudis de lligament realitzats amb animals (Huang i col., 2003a; Liu i col., 2003; Huang i Kung, 2006). Treballar amb soques d'animals presenta certs avantatges com són la possibilitat de portar a terme encreuaments, la curta durada del seu cicle reproductiu o la possibilitat d'estandarditzar els factors ambientals als quals estan sotmesos (Rogers i col., 1999; Peacock i col., 2002).

3.3. ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ

Una altra aproximació a l'estudi genètic de les malalties complexes són els estudis d'associació. En aquests estudis es pretén detectar a través de mètodes estadístics si existeix associació entre un o més marcadors genètics i un tret quantitatiu o qualitatiu relacionat amb el fenotip d'interès (revisat per Cordell i Clayton, 2005). Per dissenyar un estudi d'associació cal tenir en compte les següents variables: la mostra, el fenotip, la regió genòmica a analitzar, els polimorfismes a genotipar i els mètodes estadístics que s'utilitzaran.

En funció de la mostra d'individus escollida per realitzar l'anàlisi podem parlar d'estudis d'associació familiars i d'estudis d'associació en població no emparentada (Taula 4) (Cordell i Clayton, 2005). Entre els estudis d'associació amb individus no emparentats destaquen els estudis cas-control, en els quals s'extreu d'una mateixa població un grup d'individus afectes (casos) i un

grup d'individus sans (controls), els quals s'aparellen un a un segons l'edat i el sexe. En aquests estudis es valora a través d'un test estadístic si un determinat al·lel o genotip es troba distribuït de manera diferent en casos i controls. Les aproximacions cas-control s'apliquen per estudiar trets binaris. Pels trets quantitius es dissenyen estudis de secció, on es treballa amb una mostra d'individus obtinguda a l'atzar d'una població en un moment determinat. Si aquesta mostra es segueix estudiant al llarg del temps es parla d'estudis de cohort. En ells s'analitza si la mitjana del valor de la variable quantitativa és significativament diferent entre els grups d'individus portadors de cadascun dels genotips. Pel que fa als estudis d'associació familiar, el TDT (test de desequilibri de la transmissió) n'és el més comú (revisat per Laird i Lange, 2006). En aquest cas, la mostra consta de diversos grups de tres individus formats per un fill afecte i els seus progenitors. El TDT compara estadísticament el nombre observat d'al·lells transmesos amb el nombre d'al·lells que s'esperaria que es transmetessin per atzar. El test permet detectar tant associació com lligament.

Taula 4 Tipus d'estudis d'associació en funció de la mostra analitzada (Cordell i Clayton, 2005)

<i>Tipus</i>	<i>Subtipus</i>	<i>Detalls</i>	<i>Avantatges</i>	<i>Inconvenients</i>
Població no emparentada	Secció	Mostra a l'atzar d'una població	Estima de la prevalença	Pocs individus afectes
	Cohort	Mostra a l'atzar d'una població, la qual es segueix en el temps	Estima de la incidència	El seguiment és difícil i car
	Cas-control	Mateix nombre de casos i controls	Estima de l'efecte d'exposició	Difícil seleccionar els controls
	Valors extrems	Individus amb valors d'un tret quantitatiu extrem	Menor cost de genotipatge	Mesures de l'efecte d'exposició no reals
	Casos	S'analitzen només els casos	Detecció d'interaccions	Només es poden detectar interaccions
	Grups de DNA	S'agrupen els individus en grups de DNA	Econòmic	Menys informatius
Famílies	Cas-pares	Individu afecte i els seus progenitors	Robust contra l'estratificació	Menys poder que el cas-control
	Cas-pares-avis	Individu afecte, els seus pares i avis	Robust contra l'estratificació	Poques vegades es disposa dels avis
	Pedigrís	Famílies afectes o de la població general	Continuació dels estudis de lligament	Poc econòmic

La selecció del fenotip que s'analitzarà també és un dels factors decisius en el disseny dels estudis d'associació (Shen i col., 2005). El fenotip pot ser de tipus quantitatiu o bé qualitatiu i aquesta diferència marcarà el tipus d'anàlisi estadístic posterior. Són especialment útils els fenotips intermitjos, els quals són mesures biològiques que es troben a mig camí entre el fenotip final i el factor genètic, i que poden indicar susceptibilitat.

Els marcadors genètics analitzats en els estudis d'associació solen ser polimorfismes de canvi puntual d'un nucleòtid (SNPs) i que per tant contenen dos al·lells. Es calcula que en el genoma humà hi ha 10 milions de SNPs amb freqüències superiors al 1%. Aquests es troben distribuïts homogèniament en tot el genoma (aproximadament cada 290 pb), tenen taxes de

mutació menors que altres tipus de marcadors, poden ser usats per definir poblacions i presenten patrons de correlació amb els polimorfismes adjacents (desequilibri de lligament) (Palmer i Cardon, 2005). Els al·lels que es troben en un mateix cromosoma conformen un haplotip. Treballar amb haplotips permet enfocar l'associació des d'un punt de vista més biològic ja que per exemple els haplotips de la regió codificant corresponen directament a la seqüència proteica final (Clark, 2004). Els haplotips d'un individu a vegades es poden establir de manera directa, però altres vegades cal recórrer a programes informàtics que els estimen en funció dels haplotips directes presents en la població.

El desequilibri de lligament (LD) és el fenomen pel qual determinats al·lels es troben junts en un mateix cromosoma formant un determinat haplotip més sovint del que s'esperaria per atzar tenint en compte les seves freqüències al·lèliques (Clark, 2004; Cordell i Clayton, 2005). El LD es basa en la teoria coalescent que diu que els al·lels presents en una població en un moment determinat provenen d'un ascendent comú. El LD és, doncs, una mesura poblacional que canvia al llarg del temps segons la taxa de recombinació, la deriva genètica, la selecció natural i la taxa de mutació. Com més propers en el genoma estan dos marcadors, més LD existirà entre ells perquè, tot i que existeixen zones calentes de recombinació, el fenomen de la recombinació depèn bàsicament de la distància.

El LD es pot mesurar a través de diferents paràmetres, els més comuns dels quals són la D' i la r^2 . La D' oscil·la entre 0 i 1, on 0 significa la no existència de desequilibri de lligament entre dos *loci*, i 1 significa desequilibri total de lligament. La variable r^2 és una mesura del desequilibri de lligament que permet incloure informació sobre les freqüències al·lèliques dels polimorfismes. Donats dos polimorfismes en LD, com més similars siguin les seves freqüències al·lèliques, més elevat serà el valor de r^2 (més pròxim a 1) i ens permetrà parlar de polimorfismes "sinònims" o "redundants".

Si el LD entre un grup de polimorfismes és elevat, en la població existiran menys haplotips formats per aquests polimorfismes dels que obtindríem en realitzar totes les possibles combinacions dels seus al·lels. La regió cromosòmica que conté polimorfismes en desequilibri de lligament i que per tant se sol heretar conjuntament, s'anomena bloc haplotípic. El LD permet disminuir el nombre de marcadors a genotipar sense pèrdua d'informació o amb una pèrdua mínima. Els marcadors que defineixen tota o quasi tota la variabilitat present en un bloc haplotípic s'anomenen *tags* i es poden determinar a través de programes informàtics (Clark, 2004). El projecte internacional HapMap té com a objectius crear una base de dades pública de SNPs, amb ells reconstruir els blocs haplotípics presents en diferents poblacions i finalment facilitar la selecció de polimorfismes *tag* (HapMap C., 2005).

Gràcies a les bases de dades de polimorfismes i a la millora de les tècniques de genotipatge, s'ha passat d'analitzar un sol polimorfisme per gen, a genotipar tots els *tags* d'aquest gen o bé *tags* distribuïts per tot el genoma. Quan l'estudi d'associació es centra en un gen candidat, aquest es selecciona segons un conjunt de criteris que engloben la seva funció, la seva posició i la seva expressió (Hattersley i McCarthy, 2005).

Després de definir el concepte de desequilibri de lligament, hem de tenir en compte que les associacions positives poden ser deguts a què el polimorfisme analitzat sigui el causant del tret fenotípic (associació directa) o bé a què el polimorfisme analitzat estigui relacionat amb el polimorfisme causant de la malaltia a través del desequilibri de lligament (associació indirecta) (Cordell i Clayton, 2005). Per aquest motiu quan es detecta una associació entre un polimorfisme i un fenotip resulta necessari demostrar la funcionalitat d'aquest polimorfisme.

Els estudis d'associació moltes vegades han donat resultats contradictoris generalment a conseqüència de la subestructuració de la mostra, de la falta de potència estadística o de la multiplicitat de tests realitzats (Cordell i Clayton, 2005; Palmer i Cardon, 2005; Shen i col., 2005). Les inconsistències entre els resultats de diferents estudis d'associació, però, també poden ser degudes a diferències biològiques reals. L'etiologia complexa de les malalties multifactorials fa que l'epístasi, les interaccions gen-ambient, el fons genètic específic de cada cohort o els diferents patrons poblacionals de LD influèncin en el resultat final de l'associació.

3.3.1. Estudis d'associació amb fenotips relacionats amb l'osteoporosi

S'ha realitzat un gran nombre d'estudis d'associació de tipus cas-control, de secció o de cohort amb fenotips relacionats amb l'osteoporosi. Durant el període de dos anys entre el 2002 i el 2004 es van publicar aproximadament 170 estudis d'associació relacionats amb l'osteoporosi. Degut a la gran quantitat de literatura publicada, Liu i col·laboradors (2003 i 2006) van elaborar dues revisions exhaustives amb els resultats dels estudis d'associació apareguts fins l'any 2004. Per la seva banda, Huang i col·laboradors (2006) van revisar les associacions descrites en relació a l'osteoporosi en funció del nombre de vegades que s'havien replicat. Segons aquesta revisió, a finals del 2005 hi havia 63 gens que havien estat associats a la DMO o a altres fenotips ossis. Setze d'aquests gens s'havien trobat associats en més de 5 estudis independents, 18 s'havien trobat associats en 2-4 estudis independents, i 29 s'havien trobat associats en un sol estudi. A la Taula 5 es mostren aquests gens agrupats segons la seva funció i segons el nombre d'estudis independents que han replicat l'associació. Entre els gens que més vegades han estat associats a fenotips osteoporòtics hi ha els anomenats gens clàssics per a l'osteoporosi: *COL1A1*, *ESR1*, *VDR* i *TGFB1*.

L'osteoporosi és una malaltia d'aparició tardana, i per aquest motiu s'han realitzat pocs estudis de tipus familiar (Long i col., 2005; Zhang i col., 2005). Entre aquests trobem un estudi d'associació realitzat amb dades de 405 famílies, on s'analitzava l'efecte de diversos polimorfismes situats en 20 gens candidats per a l'osteoporosi (Xiong i col., 2006). En aquest estudi es va observar que polimorfismes situats en els gens *LRP5*, *CYP17*, *RANK*, *RANKL*, *DBP*, *CYP19*, *TNFR2* i *BMP2* influèncien la DMO.

Recentment, Reneland i col·laboradors (2005) han publicat les dades del primer estudi d'associació realitzat a gran escala en relació a l'osteoporosi. Els autors van analitzar 25.000

Introducció

polimorfismes situats en 16.000 gens i van observar que variants de la fosfodiesterasa 4D (*PDE4D*) estaven associades a la DMO.

Taula 5 Gens associats a la DMO i a altres fenotips relacionats amb l'osteoporosi (adaptat de Huang i Kung, 2006)

<i>Funció</i>	<i>Gen</i>	<i>Localització</i>	<i>Funció</i>	<i>Gen</i>	<i>Localització</i>
Gens que s'han trobat associats i el resultat s'ha replicat en 4 o més estudis independents					
Matriu extracel·lular	<i>COL1A1</i>	17q21.31-22.05	Factors creixement i R.	<i>IGF1</i>	12q22-24
	<i>COL1A2</i>	7q22	Citocines i R.	<i>OPG</i>	8q24
H. calciotròpiques i R.	<i>VDR</i>	12q13-14		<i>IL6</i>	7p21
	<i>CTR</i>	7q21		<i>TNFR2</i>	1p36
H. sexuals i R.	<i>ESR1</i>	6q25.1		<i>TNF α</i>	6p21
	<i>ESR2</i>	14q22-24	Altres	<i>LRP5</i>	11q13.4
	<i>AR</i>	Xq11-12		<i>MTHFR</i>	1p36
Factors creixement i R.	<i>TGFB1</i>	19q13.2		<i>CYP19</i>	15q21
Gens que s'han trobat associats i el resultat s'ha replicat en 1-3 estudis independents					
Matriu extracel·lular	<i>BGP</i>	1q25-31	Altres	<i>ApoE</i>	19q13
	<i>AHSG</i>	3q27		<i>CLCN7</i>	16p13
H. calciotròpiques i R.	<i>CASR</i>	3q13-21		<i>CYP17</i>	10q24.3
	<i>CT</i>	11p15		<i>KLOTHO</i>	13q12
	<i>PTH</i>	11p15		<i>SOST</i>	17q12-q21
	<i>PTH1R</i>	3p22-21		<i>PDE4D</i>	5q12
	<i>DBP</i>	4q12		<i>NCOA3</i>	20q12
Factors creixement i R.	<i>BMP2</i>	20p12		<i>OSCAR</i>	19q13.4
Citocines i R.	<i>IL1RA</i>	2q14		<i>RUNX2</i>	6p21.1
Gens que s'han trobat associats en un sol estudi					
Matriu extracel·lular	<i>PLOD1</i>	1p36.3-p36.2	Altres	<i>LCT</i>	2q21
i gens relacionats	<i>MMP-1</i>	11q22-q23		<i>PPARγ</i>	3p25
	<i>MGP</i>	12p13-12		<i>PDE4</i>	5q12
	<i>MMP-9</i>	20q11.2-q13.1		<i>HLA-A</i>	6p21
Hormones i R.	<i>GnRH</i>	8p21-p11.2		<i>NPY</i>	7p15.1
	<i>GH1</i>	17q22-q24		<i>PON1</i>	7q21.3
Factors creixement i R.	<i>IGFII</i>	11p15.5		<i>WRN</i>	8p12-11
Citocines i R.	<i>I-TRAF</i>	2q24-q31		<i>P57(KIP2)</i>	11p15
	<i>CCR2</i>	3p21		<i>DRD4</i>	11p15.5
	<i>IL10</i>	17q11.2		<i>FRA-1</i>	11q13
	<i>IRAK1</i>	Xq28		<i>TCIRG1</i>	11q13.4-q13.5
Altres	<i>RIL</i>	5q31.1		<i>CYP1A1</i>	15q22-q24
	<i>LEPR</i>	1p31		<i>SERT</i>	17q11.1-q12
	<i>QPCT</i>	2p22.2		<i>COMT</i>	22q11.2
	<i>CYP1B1</i>	2p22-p21			

El consorci Genetic Markers for Osteoporosis (GENOMOS) es va crear l'any 2003 amb la participació de diferents centres d'àmbit europeu per tal d'unir esforços en la investigació de l'osteoporosi. Un dels objectius del projecte GENOMOS és dur a terme metaanàlisis prospectives amb polimorfismes situats en els gens clàssics per a l'osteoporosi. Actualment el projecte GENOMOS ha analitzat l'efecte de 14 variants polimòrfiques situades en els gens *COL1A1*, *ESR1*, *VDR* i *TGFB1* en una mostra formada per més de 20.000 individus. El nostre grup d'investigació és

un dels membres fundadors del consorci i participa a través del genotipatge de les mostres de la cohort de dones postmenopàusiques espanyoles (BARCOS).

El present treball engloba, per una banda, els estudis d'associació en els gens candidats clàssics per a l'osteoporosi, inclosos també en el projecte GENOMOS, i per l'altre els estudis d'associació en altres gens candidats. A la Taula 6 es mostra un breu resum d'aquests gens, però la seva estructura i funció s'explica detalladament en l'apartat *Introducció 4.1. Gens analitzats en els estudis d'associació*.

Taula 6 Gens analitzats en el present treball en estudis d'associació (segons les dades del març del 2006 del UCSC Genome Bioinformatics)

Gens candidats clàssics per a l'osteoporosi (també analitzats en el projecte GENOMOS)	
<p>COL1A1</p> <p><i>Localització:</i> 17q21.33</p> <p><i>Gen:</i> 17,5 kb (51 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 1.464 aa (138,9 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Matriu extracel·lular</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i> Osteogènesi imperfecta Síndrome d'Ehlers-Danlos</p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -1997 G/T (rs1107946)</p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -1663 indelT (rs11327935)</p> <p style="padding-left: 40px;">Intró 1 Sp1 (rs1800012)</p>	<p>VDR</p> <p><i>Localització:</i> 12q13.11</p> <p><i>Gen:</i> 63,4 kb (11 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 427 aa (48,3 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Receptor de la vitamina D₃</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i> Raquitisme de tipus II</p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor Cdx2 (rs11568820)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant FokI (rs2228570)</p> <p style="padding-left: 40px;">Intró 8 BsmI (rs1544410)</p> <p style="padding-left: 40px;">Intró 8 ApaI (rs17879735)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant TaqI (rs731236)</p>
<p>ESR1</p> <p><i>Localització:</i> 6q25.1</p> <p><i>Gen:</i> 295,7 kb (8 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 595 aa (66,2 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Receptor dels estrògens</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i> Osteoporosi</p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor (TA)_n (rs3138774)</p> <p style="padding-left: 40px;">Intró 1 PvuII (rs2234693)</p> <p style="padding-left: 40px;">Intró 1 XbaI (rs9340799)</p>	<p>TGFB1</p> <p><i>Localització:</i> 19q13.2</p> <p><i>Gen:</i> 23,2 kb (7 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 390 aa (44,3 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Factor de creixement</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i> Camurati-Engelmann</p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -800 G/A (rs1800468)</p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -509 C/T (rs1800469)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant Leu10Pro (rs1982073)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant Arg25 Pro (rs1800471)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant Thr263Ile (rs1800472)</p>
Altres gens candidats per a l'osteoporosi	
<p>RUNX2</p> <p><i>Localització:</i> 6p12.3</p> <p><i>Gen:</i> 222,8 kb (8 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 521 aa (56,6 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Factor de transcripció</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i> Displàsia clidocranial</p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor 1 -330 G/T</p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor 2 -1025 T/C (rs7771480)</p>	<p>IL6R</p> <p><i>Localització:</i> 1q21</p> <p><i>Gen:</i> 64,3 kb (10 exons)</p> <p><i>Proteïna:</i> 468 aa (51,5 kDa)</p> <p><i>Funció:</i> Receptor de la IL6</p> <p><i>Malaltia monogènica:</i></p> <p><i>Polimorfismes:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -1435 C/T (rs3887104)</p> <p style="padding-left: 40px;">Promotor -208 G/A (rs4845617)</p> <p style="padding-left: 40px;">Regió codificant Asp358Ala (rs8192284)</p>

Pels gens que presenten més d'una isoforma, s'anota la isoforma de major mida

3.4. ESTUDIS FUNCIONALS

Els estudis funcionals relacionats amb les malalties complexes es poden dividir en estudis funcionals genòmics, on s'analitza l'expressió de diversos gens o bé de les proteïnes que codifiquen, i estudis de validació funcional d'un polimorfisme o haplotip associat a un fenotip. Entre els estudis funcionals també podem incloure els models animals.

3.4.1. Estudis funcionals genòmics

Els estudis funcionals genòmics serveixen per determinar quin o quins són els gens que s'expressen i les proteïnes que es sintetitzen en determinades situacions fisiològiques o patològiques (transcriptòmica i proteòmica d'expressió, respectivament) (revisat per Liu i col., 2006).

Els nivells d'expressió d'un gen poden donar informació sobre l'adequació de realitzar estudis d'associació amb polimorfismes situats en aquest gen. Però a més els mateixos nivells d'expressió poden ser usats com a fenotips intermitjos en aquests estudis (revisat per Huang i Kung, 2006).

Malgrat la gran esperança que aporten aquests nous mètodes cal tenir en compte que presenten algunes limitacions. En primer lloc cal destacar que el patró d'expressió de certs gens és específic del tipus cel·lular, del tipus de teixit i de les condicions fisiològiques. Per això l'extrapolació de resultats s'ha de fer amb precaució. En segon lloc, cal clarificar que l'expressió diferencial de determinats gens en condicions fisiològiques i en condicions patològiques no necessàriament significa que aquests gens siguin causants de la patologia final, ja que aquesta diferència pot respondre a simples mecanismes compensatoris (Huang i Kung, 2006).

A diferència dels estudis de lligament i d'associació, els estudis funcionals genòmics d'expressió en relació amb l'osteoporosi han aparegut bastant més tard. Liu i col·laboradors (2006) han revisat els estudis més rellevants obtinguts per mitjà de *microarrays* en relació a fenotips ossis. Alguns d'aquests estudis analitzen l'expressió de determinats gens en processos com la diferenciació osteoblàstica. Altres analitzen l'expressió diferencial de determinats gens en condicions fisiològiques respecte condicions patològiques o bé després del tractament amb determinades hormones, citocines o factors de creixement. La proteòmica d'expressió és la tècnica paral·lela als *microarrays* que analitza l'expressió de proteïnes. Aquesta metodologia, d'aparició relativament recent, ha estat poc usada fins ara en relació als fenotips ossis però es considera una tècnica prometedora.

3.4.2. Estudis de validació funcional de polimorfismes

Per determinar la funcionalitat d'una variant nucleotídica, cal analitzar el patró de desequilibri de lligament que manté aquesta variant amb els polimorfismes adjacents. Un cop es

decideix quin o quins són els millors polimorfismes candidats funcionals del bloc haplotípic s'ha de procedir a comprovar la seva funcionalitat.

El tipus d'estudi funcional a realitzar dependrà de la posició del polimorfisme en el gen i del tipus de proteïna codificada pel gen. Si el polimorfisme es troba en una regió reguladora es poden fer d'estudis de retardament en gel (EMSAs), estudis de gen reporter o d'estabilitat del mRNA. Si el polimorfisme comporta un canvi d'aminoàcid es poden fer estudis d'estructura de la proteïna, estudis de localització subcel·lular, estudis d'activitat enzimàtica si el gen codifica un enzim, o estudis d'interacció entre proteïnes. Cal tenir en compte que l'efecte que tenen els polimorfismes sobre els fenotips complexos és petit, de manera que el mètode experimental haurà de ser prou sensible per detectar variacions de petita magnitud (revisat per Rebbeck i col., 2004). També s'ha de tenir en compte que els estudis funcionals es realitzen *in vitro*, i que per tant moltes de les condicions fisiològiques que influeixen l'aparició d'un fenotip no són reproduïbles en aquest sistema.

3.4.3. Models animals

Els models animals han ajudat a comprendre l'etiologia de les malalties complexes. Pel que fa a l'osteoporosi, aquests models han permès investigar la fisiologia de l'adquisició del pic de massa òssia i de la pèrdua d'os a causa de la menopausa o de l'envelliment, així com també descobrir els gens que participen en aquests processos (Turner i col., 2001). Majoritàriament els models animals que han estat usats per estudiar fenotips ossis són: els ratolins, les rates i els primats (Peacock i col., 2002).

Els models de rates han estat útils per estudiar l'adquisició del pic de massa òssia i l'osteoporosi deguda a la depleció estrogènica, però l'adequació d'aquests models a l'estudi de la pèrdua de massa òssia deguda a l'envelliment és dubtosa.

L'etiologia de l'osteoporosi senil s'ha estudiat bàsicament en models de ratolí (Watanabe i Hishiya, 2005). Els models de ratolí s'obtenen a través de la selecció de soques o per mitjà de la deleció o sobreexpressió de determinats gens (Turner i col., 2001; Peacock i col., 2002).

Finalment, tot i que l'osteoporosi en primats correlaciona enormement amb la patologia en humans, aquests models presenten certs desavantatges que limiten el seu ús extensiu com per exemple que cal esperar 30 anys perquè s'iniciï el procés d'osteoporosi natural (Turner i col., 2001).

4. GENS IMPLICATS EN L'OSTEOPOROSI I ESTUDIATS EN EL PRESENT TREBALL

Existeixen multitud de gens implicats en l'osteoporosi. Seguidament es parla d'aquells que han estat estudiats en el present treball perquè s'han analitzat en estudis d'associació o en estudis funcionals relacionats amb els polimorfismes -1997 G/T i -1663 indelT del promotor del *COL1A1*.

4.1. GENS ANALITZATS EN ELS ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ

Tot seguit s'explica l'estructura dels gens que s'han analitzat en els estudis d'associació de la present tesi, així com també l'estructura i la funció de les proteïnes codificades per aquests gens. Finalment s'apunta quins són els principals polimorfismes analitzats en aquests gens en els estudis d'associació realitzats en relació a fenotips osteoporòtics.

4.1.1. *COL1A1*

Com hem comentat anteriorment, el teixit ossi està format per les cèl·lules òssies i per una matriu extracel·lular mineralitzada (*Introducció 1.3.2. La matriu extracel·lular*). El component principal d'aquesta matriu és el col·lagen de tipus I format per dues cadenes $\alpha 1(I)$ i una cadena $\alpha 2(I)$, les quals són sintetitzades a partir del gens *COL1A1* i *COL1A2*, respectivament (Fig.7).

El gen *COL1A1* està localitzat a 17q21.31-22.05 (Retief i col., 1985). La seva mida és de 17,5 kb, està format per 51 exons i se li coneix un únic promotor altament conservat (Chu i col., 1984; Chu i col., 1985). La cadena $\alpha 1(I)$ de 1.464 aminoàcids consta de 338 triplets de Gly-X-Y, on X pot ser qualsevol aminoàcid però majoritàriament és una prolina, i Y és normalment una hidroxiprolina (Chu i col., 1984). El residu de glicina, situat cada tres aminoàcids, és un requisit per a la formació de la triple hèlix de les fibres de col·lagen.

El col·lagen de tipus I desenvolupa una funció mecànica ja que dóna elasticitat i estructura als teixits. En l'os té la capacitat d'absorbir l'energia mecànica a la qual està sotmès aquest òrgan (revisat per Viguet-Carrin i col., 2006). Tant la quantitat com la qualitat de les fibres de col·lagen influeixen la massa i la microarquitectura òssies, i per això desregulacions en els nivells d'expressió podrien comportar alteracions òssies.

El gen *COL1A1* s'expressa en diversos teixits, durant diferents estadis del desenvolupament i en diferents condicions fisiològiques en l'adult. Per tal d'estudiar els mecanismes de regulació del gen *COL1A1*, s'han utilitzat diverses metodologies que inclouen els gens reporters i els *minigens* introduïts de manera transitòria o estable en cèl·lules en cultiu o bé en animals transgènics. Degut a la gran complexitat que regeix la regulació gènica i a les

limitacions dels mètodes experimentals, els resultats obtinguts han estat moltes vegades contradictoris.

Els resultats de diversos experiments han permès determinar que es necessiten 3,5 kb o 2,3 kb del promotor del *COL1A1* per obtenir una expressió específica de teixit i similar a l'endògena en la majoria dels teixits analitzats (Slack i col., 1991; Bedalov i col., 1994). Mitjançant ratolins transgènics, s'ha establert que la seqüència delimitada entre 2,3 kb i 1,7 kb del promotor de rata és necessària per a l'expressió del col·lagen en ossos i dents, mentre que la seqüència entre 3,5 kb i 1,7 kb en controla l'expressió en tendons (Bogdanovic i col., 1994). Rossert i col·laboradors (1995) van obtenir resultats similars amb el promotor de ratolí.

Pel que fa al teixit ossi, diferents regions del promotor de *COL1A1* s'han vist implicades en la regulació de la transcripció en funció de si l'experiment ha estat realitzat *in vitro* o bé *in vivo*. Mentre que en animals transgènics la regió principal de regulació de la transcripció en l'os es troba entre 2,3 kb i 1,7 kb a 5' de l'inici de transcripció, en cèl·lules osteoblàstiques en cultiu, la transcripció màxima depèn del fragment delimitat entre 3,5 kb i 2,3 kb (Krebsbach i col., 1993). Aquestes diferències han estat atribuïdes a diferències en la microarquitectura òssia entre les cèl·lules *in vivo* i *in vitro*. En cèl·lules osteoblàstiques, s'ha vist que el promotor basal, situat entre -220 pb i +40 pb, dirigeix l'expressió màxima, mentre que el fragment delimitat entre -1.284 pb i -254 pb actua com a repressor (Jimenez i col., 1994; Buttner i col., 2004; Garcia-Giralt i col., 2005). Existeix certa controvèrsia sobre els efectes reguladors de l'intró 1 i de la regió 3'UTR del gen del *COL1A1* (Bornstein, 1996). En el teixit ossi sembla, però, que l'efecte que pot tenir l'intró 1 en la regulació de la transcripció és mínim (Liska i col., 1994).

Mutacions en el gen *COL1A1* poden causar tant osteogènesi imperfecta com la síndrome d'Ehlers-Danlos (revisat per Roughley i col., 2003). Els pacients amb osteogènesi imperfecta presenten, entre altres símptomes, fragilitat òssia i una disminució de la massa òssia; i els pacients amb la síndrome d'Ehlers-Danlos manifesten una sèrie d'alteracions generalitzades en els teixits connectius.

Diversos polimorfismes situats en el gen *COL1A1* han estat associats a fenotips osteoporòtics. Els més estudiats són dos polimorfismes situats en el promotor, -1997 G/T i -1663 indelT, i un polimorfisme situat a l'intró 1 (Sp1) (Grant i col., 1996; Garcia-Giralt i col., 2002). S'han realitzat estudis funcionals amb tots tres polimorfismes (Mann i col., 2001; Garcia-Giralt i col., 2005).

4.1.2. VDR

El teixit ossi és el reservori de calci més important del cos. Les concentracions extracel·lulars de calci estan regulades mitjançant un equilibri dinàmic on participen l'intestí, el ronyó, l'os i les hormones calciotrópiques: la PTH, la calcitonina i la vitamina D₃. En condicions d'hipocalcèmia les cèl·lules de les glàndules paratiroides secreten la PTH que estimula la resorció òssia, frena l'eliminació de calci per part dels ronyons i n'afavoreix l'absorció intestinal. Quan es

Introducció

presenten nivells elevats de calci en sang, s'inhibeix la secreció de la PTH per part de les glàndules paratiroides alhora que les cèl·lules de la tiroides secreten la calcitonina que desenvolupa l'efecte invers a la PTH. Per la seva banda, la vitamina D₃ incrementa l'absorció intestinal de calci i participa en processos d'immunomodulació i en la regulació del teixit ossi i muscular.

La vitamina D₃ és una hormona esteroïdal liposoluble que s'obté a través de la dieta o per modificació de molècules precursors gràcies a la intervenció de la llum UV en un procés que té lloc a la pell (revisat per Dusso i col., 2005). Per mitjà d'una sèrie de reaccions que es donen principalment en el fetge i el ronyó, la vitamina D₃ és modificada fins a donar la forma bioactiva, la 1,25-dihidroxitamina D₃ o calcitriol. En la cèl·lula, la forma activa pot interactuar amb receptors de membrana que faciliten el transport de calci a través de la membrana plasmàtica i comporten respostes ràpides (revisat per Hurley i Lorenzo, 2004). Respostes més lentes s'obtenen quan la 1,25-dihidroxitamina D₃ interacciona amb el receptor nuclear VDR. Aquest, un cop unit al lligand, heterodimeritza amb el receptor RXR. Els receptors VDR i RXR són membres de la família de receptors nuclears de les hormones esteroïdals.

El receptor VDR està codificat pel gen del mateix nom situat a 12q13-q14 (Labuda i col., 1992). Miyamoto i col·laboradors (1997) van descriure que el gen s'estenia al llarg de 75 kb i contenia 11 exons. Posteriorment es va apuntar que el nombre d'exons era com a mínim de 14 (Crofts i col., 1998). La seqüència de la proteïna està codificada per 8 exons (exó 2-exó 9) i la regió no codificant a 5' inclou diversos exons 1 (Fig 13). Més a 5' de l'exó 1A hi ha una seqüència rica en GCs que funciona com a regió promotora a falta de caixa TATA. S'han detectat diversos transcrits que provenen de l'ús diferencial de diversos promotors i d'*splicings* alternatius. Existeixen dues isoformes proteïques majoritàries amb una massa molecular aproximada de 48 kDa i que contenen 427 i 424 aminoàcids (Baker i col., 1988; Miyamoto i col., 1997; Crofts i col., 1998). El receptor VDR presenta diversos dominis proteics: un domini d'unió al DNA (N-terminal), un domini que fa de frontissa (*hinge*), un domini d'unió al lligand (C-terminal) i diversos dominis d'heterodimerització amb RXR i altres cofactors (revisat per Dusso i col., 2005; Nagpal i col., 2005); (Fig. 13).

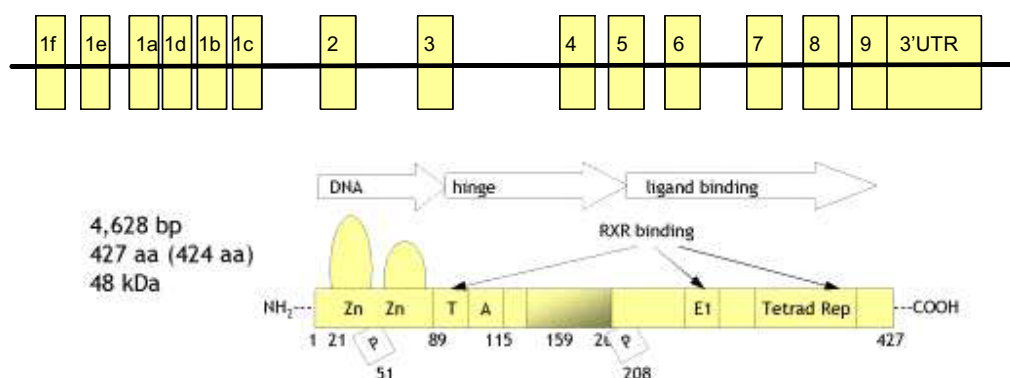


Fig. 13 Estructura gènica i proteica del receptor de la vitamina D₃ (VDR). S'observa el domini d'unió al DNA, el domini que fa de frontissa (*hinge*), el domini d'unió al lligand i els dominis de dimerització amb RXR. També es mostren els punts de fosforilació de la molècula (adaptat de Crofts i col., 1998 i Wjst, 2005).

L'heterodímer RXR-VDR, un cop translocat al nucli, s'uneix a seqüències nucleotídiques del tipus 5'-AGG/TTCA-3' anomenades VDRE (elements de resposta a la vitamina D₃). L'heterodímer actua reclutant diversos factors que regularan la transcripció gènica.

In vivo, s'ha observat que la 1,25-dihidroxitamina D₃ disminueix la resorció i estimula la formació òssia en dones osteoporòtiques i en animals ovariectomitzats (Nagpal i col., 2005). Els efectes anabòlics de la 1,25-dihidroxitamina D₃ es produeixen, en primera instància, gràcies a l'increment de l'absorció intestinal de calci i gràcies a la inhibició de la síntesi de PTH. En segon lloc, la 1,25-dihidroxitamina D₃ promou la producció de proteïnes de la matriu extracel·lular. En paral·lel als efectes anabòlics, la 1,25-dihidroxitamina D₃ afavoreix la resorció òssia a través de l'estimulació de la síntesi de RANKL.

La vitamina D₃ és essencial pel desenvolupament i el manteniment de l'esquelet. Deficiències de vitamina D₃ comporten raquitisme en els infants i osteomalàcia en els adults. Ambdues malalties es caracteritzen per una mineralització deficient de l'os. El raquitisme, però, també pot ser causat per mutacions en el gen *VDR*, és l'anomenat raquitisme de tipus II (revisat per Riancho, 2004). El ratolí *knock out* pel gen *Vdr* manifesta, després de l'etapa de deslletament, problemes en el creixement, en la formació òssia i en la reproducció (Yoshizawa i col., 1997). Els problemes ossis que desenvolupa aquest ratolí són similars als causats pel dèficit de vitamina D₃ en humans.

El polimorfisme *BsmI* situat a l'extrem 3'UTR del gen *VDR* va ser el primer polimorfisme que es va trobar associat a la DMO (Morrison i col., 1994). Amb posterioritat s'han estudiat diversos polimorfismes situats en tot el gen. Entre aquests hi ha el polimorfisme *Cdx2* situat en el promotor, el polimorfisme *FokI* que dona lloc a un inici de traducció alternatiu, i dos polimorfismes, *Apal* i *TaqI*, que es troben en desequilibri de lligament amb la variant *BsmI*. Aquests i altres polimorfismes també s'han trobat associats a malalties com l'hiperparatiroidisme o el càncer (revisat per Valdivielso i Fernandez, 2006).

4.1.3. *ESR1*

Les hormones sexuals participen en gran nombre de processos fisiològics relacionats amb el creixement, el desenvolupament i la diferenciació de diversos teixits. En concret, els estrògens, les hormones sexuals femenines, participen en la formació, el creixement, el dimorfisme sexual, el tancament de les epífisis i el remodelatge de l'esquelet (revisat per Manolagas i col., 2002). En les dones tant l'ovariectomia com la menopausa són motiu d'un excés de remodelatge i en conseqüència una ràpida pèrdua d'os, sobretot d'os trabecular (revisat per Syed i Khosla, 2005). Però la regulació òssia per part dels estrògens té lloc tant en homes com en dones.

L'acció dels estrògens es dona a través de receptors de membrana o dels receptors nuclears: ER α i ER β . ER α i ER β actuen, en unir-se al lligand, com a factors de transcripció. Els osteoblasts, els osteoclasts i els seus progenitors expressen ambdós receptors, però amb un patró d'expressió diferencial: mentre que ER α predomina en l'os cortical, ER β predomina en l'os

Introducció

trabecular (revisat per Gennari i col., 2005). ER β sembla desenvolupar funcions inverses a ER α en la modulació del creixement i de la mida dels ossos longitudinals. En l'os trabecular, però, ambdós receptors tenen funcions similars. En general es sol acceptar que ER α té un paper més important en la regulació òssia que no pas ER β , la funció del qual no és del tot coneguda (revisat per Deroo i Korach, 2006).

El receptor α dels estrògens (ER α) està codificat pel gen *ESR1*, el qual es troba a 6q25.1, conté 8 exons i s'estén al llarg d'unes 300 kb (Ponglikitmongkol i col., 1988; Menasce i col., 1993; Kos i col., 2001). Com altres membres de la família de receptors d'hormones esteroïdals, té set promotors i diversos inicis de transcripció (Kos i col., 2001). S'han dut a terme diversos intents de caracteritzar els diferents promotors del gen *ESR1* en diverses línies cel·lulars i s'ha vist que molts promotors no tenen la caixa TATA, ni la caixa CCAAT, ni regions GCs i són relativament dèbils. Els promotors que són utilitzats en tots els teixits aporten nivells basals del receptor i els promotors específics de teixit refinen els nivells de mRNA requerits. Tot i l'existència de múltiples transcrits amb diferents extrems 5'UTR, l'existència de diverses isoformes proteiques ha estat difícil de confirmar (revisat per Deroo i Korach, 2006).

La proteïna majoritària, de 595 aminoàcids i 66,2 kDa, conté diversos dominis: dos dominis de modulació de la transcripció (A/B i E/F), un domini d'unió al DNA en la part central que conté dos dits de zinc (C), dos dominis de localització nuclear (D i E), dos dominis de dimerització (C i E) i finalment un domini d'unió als estrògens (E) (revisat per Klinge, 2000); (Fig. 14). Les seqüències del DNA reconegudes per aquest receptor són caixes palindròmiques anomenades EREs (elements de resposta a estrògens) (5'-GGTCAnnnTGACC-3') (Klein-Hitpass i col., 1988). L'afinitat que presenta el receptor per aquestes caixes és baixa, però augmenta en el moment en què el receptor s'uneix al lligand. El complex ER α -ligand modula la torsió del DNA tot reclutant factors que regularan la transcripció (revisat per Klinge, 2000).

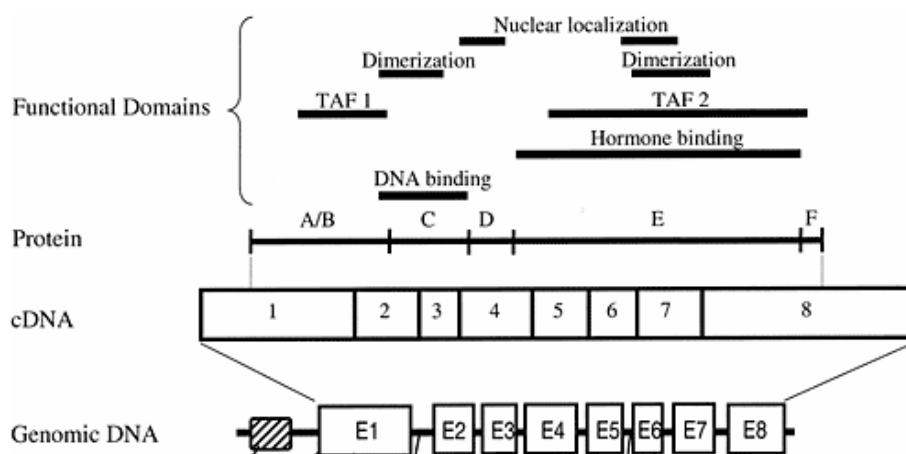


Fig. 14 Estructura gènica d'*ESR1* i de la proteïna ER α . Els dominis principals són les regions de translocació nuclear, de dimerització, d'unió al DNA, d'unió als estrògens i de transactivació (TAF) (Gennari i col., 2005).

Els estrògens frenen el remodelatge ossi tot estimulant la formació d'os nou i reduint la resorció. Aquest darrer efecte és promogut a través de la disminució de la producció de factors i citocines com el RANKL, la IL1, la IL6 i el TNF α (Syed i Khosla, 2005). Entre les citocines que estimulen l'osteoclastogènesi cal destacar la IL6 i els seus receptors: IL6R i gp130 (Manolagas i col., 2002). Degut a l'origen de les cèl·lules osteoclàstiques i al gran nombre de citocines que intervenen en la seva regulació, s'ha proposant que la funció antiresortiva dels estrògens està íntimament lligada al sistema immunològic i a l'estrès oxidatiu (revisat per Weitzmann i Pacifici, 2006). A més de l'efecte antiresortiu, els estrògens estimulen la diferenciació osteoblàstica en detriment de la diferenciació adipocitària (Syed i Khosla, 2005).

El paper dels estrògens en la regulació de l'os a través del receptor ER α va quedar totalment confirmat en trobar mutacions en el gen que codifica aquesta proteïna en un home jove adult amb un fenotip de baixa DMO i un tancament incomplet de les epífisis (Smith i col., 1994).

Variacions més lleus en el gen *ESR1*, com són els polimorfismes, s'han associat a diverses malalties, entre elles l'osteoporosi (Gennari i col., 2005; Deroo i Korach, 2006). Els polimorfismes més estudiats són dos SNPs intrònics, *PvuII* i *XbaI*, i un microsatèl·lit (TA)_n situat en la regió promotora.

4.1.4. *TGFB1*

Existeix un gran nombre de factors de creixement que juguen un paper important en la regulació del remodelatge ossi com per exemple els de la superfamília TGF β (Transforming Growth Factor Beta). Aquesta superfamília està formada per proteïnes dimèriques que es troben presents en organismes tant diversos com els invertebrats i els mamífers. En humans, aquestes proteïnes són codificades per 42 pautes de lectura oberta i es caracteritzen pel fet que totes presenten 6 residus de cisteïna conservats. La superfamília TGF β inclou dues famílies: la família TGF β /Activin/Nodal i la família BMP/GDF/MIS (revisat per Feng i Derynck, 2005).

La subfamília TGF β inclou el β 1, el β 2 i el β 3, i tot i que han aparegut per duplicació, les seves funcions no són redundants. El TGF β 1 regula un gran nombre de processos biològics entre ells la proliferació, la supervivència, la diferenciació i la migració cel·lular (revisat per Janssens i col., 2005). La combinació d'aquests efectes fa que el TGF β 1 tingui un paper destacat en la resposta immune, en l'angiogènesi, en el desenvolupament i en la formació òssia.

El gen que codifica la proteïna TGF β 1 es troba a 19q13.1-q13.3 i té 7 exons (Fujii i col., 1986; Derynck i col., 1987). La proteïna resultant està formada per 390 aminoàcids que constitueixen tres parts ben diferenciades: el pèptid senyal (fins a l'aminoàcid 29), el pèptid associat latent (LAP, fins a l'aminoàcid 279) i el pèptid madur (extrem C-terminal) (Derynck i col., 1984). La proteïna és sintetitzada en forma de pre-pro-pèptid i pateix un procés de maduració en el reticle endoplasmàtic i en l'aparell de Golgi fins a donar el complex latent petit (SLC) i el complex latent gran (LLC) que s'emmagatzemen a la matriu extracel·lular (ECM). Aquest procés es mostra en la Figura 15 (Janssens i col., 2005).

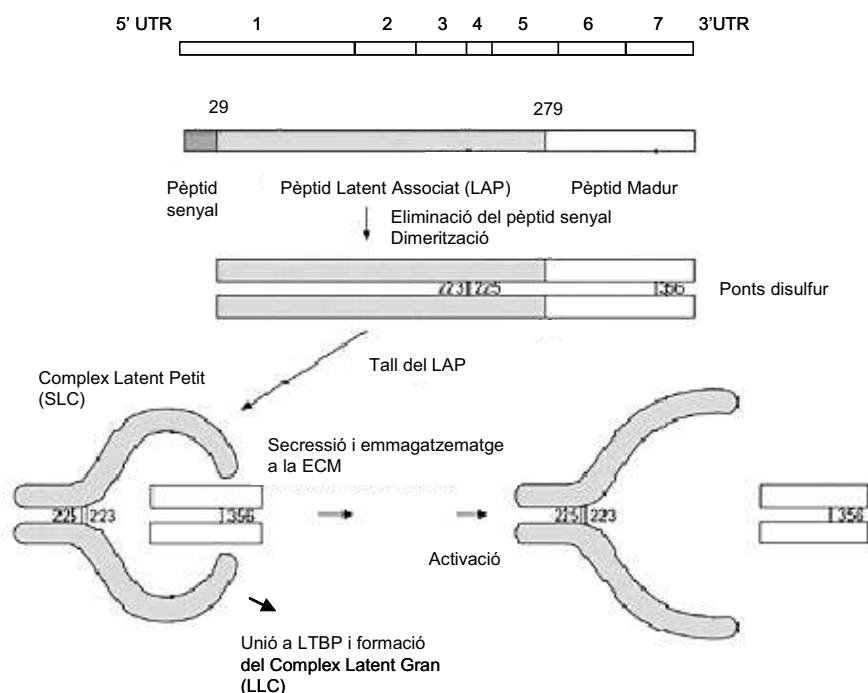


Fig. 15

Processament de la proteïna TGFβ1. El gen conté 7 exons i codifica el pre-pro-peptid. Després de processar-se el peptid senyal, dues molècules dimeritzen mitjançant 3 ponts disulfur (aa 223, 225 i 356). Seguidament es processa el peptid latent associat (LAP), el qual protegeix el dímer madur formant el complex latent petit (SLC). Aquest es pot associar per mitjà d'enllaços covalents a la proteïna d'unió al TGFβ latent (LTBP) i així formar el complex latent gran (LLC). Posteriorment el LLC i el SLC es

secreten i s'emmagatzemen a la matriu extracel·lular (ECM). Finalment a partir del SLC i del LLC s'allibera el TGFβ1 actiu (modificat de Janssens i col., 2000; Janssens i col., 2005).

A partir del SLC i del LLC s'allibera el TGFβ1 actiu gràcies a l'ambient àcid produït pels osteoclasts i a les proteases que aquests alliberen per tal de degradar la matriu (Janssens i col., 2005). El mecanisme d'acció dels membres de la superfamília TGFβ té lloc a través d'un sistema dual de receptors de membrana que senyalitzen a través de la via de les Smad o bé de les MAPK (Feng i Derynck, 2005; Janssens i col., 2005); (*Introducció 4.2.2. BMP2*).

In vitro, el TGFβ1 estimula la formació òssia a través del reclutament de progenitors osteoblàstics, estimulant-ne la proliferació i promovent-ne els primers estadis de diferenciació (Janssens i col., 2005). Els últims estadis de diferenciació i de mineralització, però, són bloquejats pel TGFβ1 i promoguts per factors com les BMPs (Janssens i col., 2005; Ryoo i col., 2006).

També s'ha vist que *in vitro*, el TGFβ1 regula l'osteoclastogènesi de manera directa i també de manera indirecta a través del sistema RANK-RANKL-OPG (Janssens i col., 2005). A baixes concentracions de TGFβ1, s'estimula la diferenciació dels osteoclasts degut a que augmenta la proporció de RANKL respecte OPG. A altes concentracions de TGFβ1, aquest bloqueja l'expressió del RANKL i estimula l'expressió de l'OPG, fet que inhibeix l'osteoclastogènesi. Contràriament a aquest darrer resultat, s'ha observat que en cultius d'osteoclasts aïllats, altes concentracions de TGFβ1 no suprimeixen l'osteoclastogènesi, sinó que l'estimulen.

Els ratolins als quals se'ls ha deletat algun dels gens que codifiquen els membres de la família TGFβ, els seus receptors o bé les proteïnes de la cascada de senyalització, manifesten greus problemes en els processos d'osteogènesi, fet que apunta la importància d'aquestes

proteïnes en l'os (Janssens i col., 2005). En concret, la deleció de *Tgfb1* produeix una disminució del nombre d'osteoblasts en l'os trabecular, problemes de proliferació i diferenciació condrocitària i un balanç negatiu en el remodelatge ossi (Geiser i col., 1998; Atti i col., 2002). Els ossos d'aquests ratolins resulten més fràgils i presenten un baix grau de mineralització.

Entre altres patologies, mutacions en el gen *TGFB1* causen la malaltia de Camurati-Engelmann (CED), un trastorn ossi d'herència autosòmica dominant (Janssens i col., 2000). Els pacients presenten una disminució de la resorció òssia en combinació amb un excés d'activitat osteoblàstica que comporta dolor ossi, debilitat muscular, fatiga i una manera de caminar característica.

En els estudis d'associació entre el *TGFB1* i fenotips ossis, s'han genotipat principalment dos polimorfismes situats en el promotor (-800 G/A i -509 C/T) i tres polimorfismes no sinònims: dos situats en el pèptid senyal (Leu10Pro i Arg25Pro) i un en el pèptid latent associat (LAP) (Thr263Ile) (Janssens i col., 2005).

4.1.5. *RUNX2*

El gen *RUNX2* també anomenat *CBFA1* codifica un factor de transcripció de la família *runt* essencial per a la diferenciació osteoblàstica (Fig. 4). El gen *RUNX2* es troba situat a 6p12.3-p21.1, s'estén aproximadament 220 kb, conté 8 exons i produeix dues isoformes majoritàries degudes a l'ús diferencial de dos promotors (P1 i P2), i altres formes minoritàries a causa d'*splicings* alternatius (Zhang i col., 1997; Stock i Otto, 2005); (Fig. 16). La isoforma II (anomenada MASNS pels seus primers aminoàcids), provinent del promotor 1 (P1), dona una proteïna major que la isoforma I (MRIPV) del promotor 2 (P2) (Geoffroy, 1998; Xiao, 1998; Terry i col., 2004). Una tercera isoforma, també diferent en l'extrem N-terminal, ha estat descrita en ratolí i rata, però no en humans (Ducy i col., 1997). Aquesta és deguda a un inici de traducció alternatiu situat en l'exó 1 de l'isoforma II (MLHSPH).

La proteïna Runx2 s'uneix al DNA mitjançant el seu domini *runt* (RHD) (Thirunavukkarasu K, 1998), (Fig. 16). El domini d'activació de Runx2 es troba en l'extrem N-terminal i en la regió consecutiva rica en glutamines i alanines (QA). La regió C-terminal de Runx2, anomenada domini PST, ja que és rica en prolines, serines i treonines, conté un domini activador i un domini repressor. El senyal de localització al nucli (NLS) es troba a continuació del domini *runt* (RHD) i el senyal d'anclatge a la matriu nuclear (NMTS) es troba al mig del domini PST.

Runx2 va ser descobert com una proteïna nuclear present en els osteoblasts i que s'unia a caixes OSE2 (5'-AACCCAC-3'), elements en *cis* que es troben en la majoria de gens específics d'osteoblasts (Ducy i col., 1997). L'acció de Runx2 com a factor de transcripció consisteix en afavorir la reorganització de la maquinària transcripcional en el context tridimensional de la matriu nuclear (revisat per Stein i col., 2004). Runx2 es pot considerar, doncs, un factor arquitectònic (revisat per Bidwell i col., 2001).

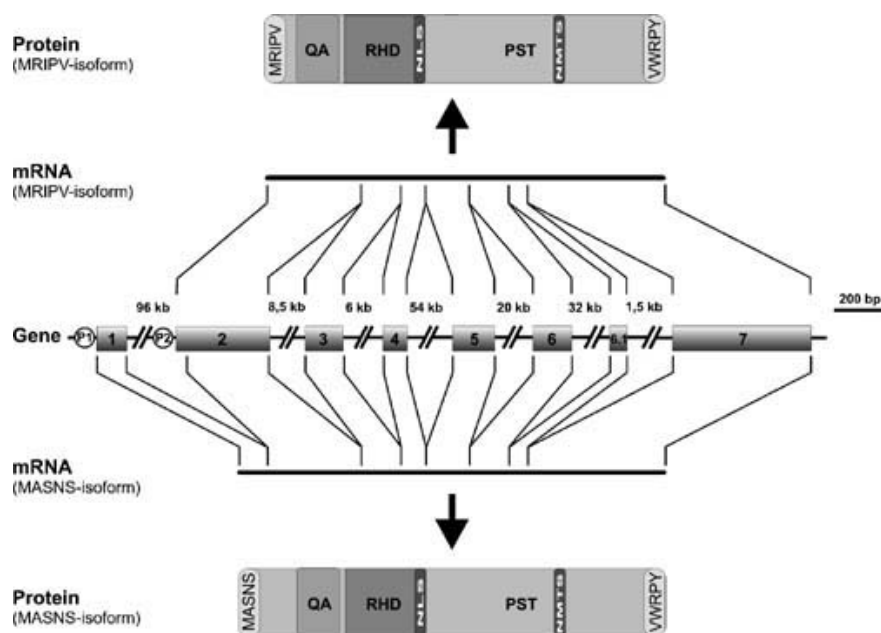


Fig. 16 Estructura del gen *RUNX2* i de les dues isoformes majoritàries. QA: domini activador de glutamines i alanines; RHD: domini d'homologia a *runt*; NLS: senyal de localització nuclear; PST: regió rica en prolines, serines i treonines; NMTS: senyal de localització a la matriu nuclear; VWRPY: domini d'interacció amb TLE/groucho (Stock i Otto, 2005).

El *knock out* de *Runx2* en homozigosi és letal degut a la falta de formació òssia endocondral i intramembranosa (Komori, 1997; Otto, 1997). El fenotip resultant del *knock out* en heterozigosi és el d'un ratolí amb defectes esquelètics similars als que presenten els pacients amb displasia clidocranial (CDD), una malaltia autosòmica dominant causada per mutacions en el gen *RUNX2* (Otto, 1997; Mundlos, 1999). Els malalts es caracteritzen per tenir una estatura baixa, la dentició tardana i supernumerària, l'absència de clavícules, i altres defectes esquelètics, entre ells la presència d'osteoporosi. D'altra banda, i de manera poc esperada, s'ha observat que els ratolins que sobreexpressen *Runx2* tenen un fenotip d'osteopènia i múltiples fractures degut a la falta de maduració dels osteoblasts (Liu i col., 2001).

La creació d'un ratolí mutant que expressa una forma de *Runx2* que actua com a dominant negatiu sota el control del promotor del gen de l'*Osteocalcina* ha posat en evidència la funció de *Runx2* en el manteniment del teixit ossi en l'adult. El ratolí transgènic efectua el procés de diferenciació cap a osteoblast, però dues setmanes després del naixement experimenta una pèrdua d'os deguda a la disminució de deposició de matriu extracel·lular (Ducy i col., 1999).

Els estudis *in vitro* per avaluar la funció diferencial d'ambdues isoformes han donat resultats contradictoris (Stock i Otto, 2005). Tot i això, en un primer moment es va proposar que *Runx2 II* era la isoforma específica de l'os i *Runx2 I* tenia una funció més general ja que el seu patró d'expressió era més ampli. Recentment, Xiao i col·laboradors (2004) per tal d'establir les diferències funcionals d'ambdues isoformes *in vivo*, han obtingut un ratolí transgènic deficient en la isoforma II mitjançant la disrupció del P1 i l'exó1 contigu. Els homozigots II^{-/-} presenten un fenotip normal pels ossos provinents de l'ossificació intramembranosa, però deficiències en l'ossificació endocondral. Els heterozigots tot i presentar ambdues ossificacions correctes, són osteopènics. En resum, doncs, sembla que ambdues isoformes són importants en l'os ja que *Runx2 I* (P2) és suficient per a l'osteoblastogènesi primària i per a la formació d'os intramembranós, mentre que la

isoforma II (P1) és necessària per a la completa maduració osteoblàstica i la formació d'os endocondral.

Degut a l'important paper que juga Runx2 en l'os, la seva regulació està altament controlada (revisat per Komori, 2005). La regulació de la transcripció és bàsica per tal d'establir el patró correcte durant el desenvolupament embrionari de l'os. Els promotors P1 i P2 estan altament conservats entre diferents espècies. El P1 està organitzat en dues regions altament conservades: el P1 proximal (de -113 pb a -1 pb) i el P1 distal (de -458 pb a -304 pb que actua com a repressor). Ambdues regions estan separades per un fragment ric en GCs crucial per a la transcripció (Stock i Otto, 2005). Mentre que 0,6 kb del P1 semblen suficients per a l'expressió de Runx2 *in vitro*, més de 3 kb són necessàries per a l'expressió *in vivo*. És important també destacar l'autoregulació que realitza Runx2 sobre si mateix a través de caixes OSE2 situades en el P1 (Drissi i col., 2000).

Vàries hormones, citocines i factors de creixement regulen l'expressió o l'activació de Runx2 com per exemple el sistema Wnt/Lrp5, Dlx5, les BMPs, els estrògens, el TGFβ1 o la vitamina D₃ (Komori, 2005). La regulació de la traducció i certes modificacions post-traduccionals com la fosforilació permeten disposar de molècules de Runx2 funcionals de manera immediata.

Runx2, per ser funcional, necessita interaccionar amb Cbfb. Cbfb és una proteïna petita de la família *runt*, la qual no té domini d'unió al DNA (Kundu i col., 2002; Yoshida i col., 2002). A part de Cbfb, Runx2 pot interactuar amb un gran nombre de proteïnes activadores o repressores de la transcripció. El reclutament de proteïnes és una de les característiques de Runx2 ja que té un rol central en el reclutament de la maquinària transcripcional i en la reorganització de la cromatina (Stein i col., 2004).

Tot i la gran importància que té Runx2 en la diferenciació osteoblàstica, pocs estudis d'associació s'han realitzat en relació a l'osteoporosi. Recentment, Doecke i col·laboradors (2006) van dur a terme una cerca de polimorfismes al llarg del gen i van descriure que certs polimorfismes situats en el P2 i en l'exó 1 contigu es trobaven associats a la DMO femoral.

4.1.6. IL6R

Les citocines són proteïnes hidrosolubles generalment de baix pes molecular, l'estructura de les quals es sol estabilitzar per mitjà de glicosilacions i de ponts disulfur. Les citocines intervenen en la regulació autocrina, paracrina o endocrina d'un ampli nombre de processos biològics. Es poden classificar segons la seva resposta inflamatòria, segons la seva estructura i segons els receptors als quals s'uneixen (revisat per Heinrich i col., 1998).

La IL6 és el membre principal de la família de citocines que senyalitzen a través del receptor de membrana gp130 i transdueixen el senyal bàsicament per mitjà del sistema JAK/STAT i ras/MAPK (Heinrich i col., 1998). Concretament, la IL6 actua a través d'un complex format pel receptor gp130 i pel receptor IL6R (gp80). El primer s'expressa en molts òrgans, en canvi, el IL6R presenta un patró d'expressió més restringit (Saito i col., 1992; Udagawa i col., 1995; Franchimont i col., 2005).

El IL6R està codificat pel gen del mateix nom situat a 1q21.3 i que conté 10 exons (Kluck i col., 1993). La proteïna codificada per aquest gen és de 468 aminoàcids, té un pèptid senyal de 19 aminoàcids, un sol domini transmembrana de 28 aminoàcids i un domini citoplasmàtic de 82 aminoàcids que no té capacitat transsenyalitzadora (Yamasaki i col., 1988; Heinrich i col., 1998). El IL6R pot existir com a isoforma de membrana o com a isoforma soluble (sIL6R) produïda o bé per l'alliberament proteolític de la isoforma de membrana o per *splicing* alternatiu (revisat per Jones i col., 2001). Les dues formes solubles difereixen en una petita seqüència aminoacídica de l'extrem C terminal. El tall proteolític, que té lloc entre els aminoàcids 357Gln i 358Asp i que acompanya la formació de la forma soluble, està inhibit pels estrògens (Mullberg i col., 1994; Manolagas i col., 2002). La capacitat d'unió al lligand de la forma soluble i de la forma de membrana és similar i el complex IL6-sIL6R actua com a agonista del senyal unint-se al receptor gp130 en cèl·lules que no presenten IL6R en les seves membranes (revisat per Kallen, 2002). Aquest procés s'anomena transsenyalització.

La IL6 és una citocina pleiotròpica que participa en un gran nombre de processos biològics. En l'os, la IL6 està produïda pels osteoblasts, monòcits i cèl·lules T. Sobre els osteoblasts té un rol antiapoptòtic i diferenciador (Bellido i col., 1998; Jilka i col., 1998; Erices i col., 2002). Vermes i col·laboradors (2002) van observar que per tal que els osteoblasts transdueixin el senyal de la IL6, el seu receptor de membrana ha de ser tallat i alliberat com a forma soluble (sIL6R). En general, però, es pot considerar que l'acció principal de la IL6 en l'os és afavorir la resorció òssia a través de l'estimulació de l'osteoclastogènesi (Jilka i col., 1992; Tamura i col., 1993). Tot i que en principi tant els osteoblasts com els osteoclasts presenten el receptor IL6R en les seves membranes, l'acció de la IL6 en els osteoclasts sembla estar promoguda per les molècules del sistema RANK-RANKL-OPG produïdes pels osteoblasts en resposta a la IL6 (Udagawa i col., 1995; Palmqvist i col., 2002).

Els nivells sèrics de IL6 i de sIL6R es troben elevats en malalties autoimmunes, neurològiques o òssies (Kallen, 2002). En concret, nivells plasmàtics elevats de IL6 i sIL6R s'han observat en processos com la diabetis de tipus II, l'obesitat, l'osteoporosi, la menopausa i l'envelliment (Mohamed-Ali i col., 1997; Fried i col., 1998; Kado i col., 1999; Abrahamsen i col., 2000; Giuliani i col., 2001; Scheidt-Nave i col., 2001).

Els ratolins als quals se'ls ha deletat el gen *Il6* estan protegits contra la pèrdua de massa òssia produïda per l'ovariectomia i la conseqüent depleció estrogènica (Poli i col., 1994). Aquests ratolins també desenvolupen obesitat d'aparició tardana (Wallenius i col., 2002).

S'han realitzat diversos estudis d'associació amb polimorfismes situats en el gen *IL6* en relació a fenotips osteoporòtics (revisat per Ferrari i Rizzoli, 2005). Fins ara, però, no s'han estudiat polimorfismes en el gen *IL6R* en relació a l'osteoporosi tot i que és un bon gen candidat tant funcional com posicional (el gen es troba situat en un *locus* identificat en estudis de lligament amb fenotips osteoporòtics) (revisat per Huang i Kung, 2006). D'altra banda, polimorfismes situats en el gen *IL6R* han estat associats a fenotips com l'obesitat, la diabetis i la periodontitis.

4.2. GENS ANALITZATS EN ELS ESTUDIS FUNCIONALS RELACIONATS AMB ELS SNPs DEL PROMOTOR DEL GEN *COL1A1*

Prèviament a aquesta tesi en el nostre grup d'investigació s'havien descrit els polimorfismes -1997 G/T i -1667 indelT situats en el promotor del gen *COL1A1*. Tant el polimorfisme -1997 G/T com la interacció d'aquest amb el SNP -1663 indelT es van trobar associats a la DMO de columna en una mostra de 256 dones postmenopàusiques espanyoles (Garcia-Giralt i col., 2002). Els dos polimorfismes van mostrar unions específiques d'al·lel a factors nuclears dels osteoblasts. Un dels factors identificat en el complex proteic retingut per la sonda que contenia el polimorfisme -1663 indelT va ser la proteïna CIZ/NMP4 (Garcia-Giralt i col., 2005).

4.2.1. CIZ/NMP4

Nakamoto i col·laboradors (2000) van identificar la proteïna CIZ (p130^{cas} Interacting Zinc Finger Protein), a través de la seva interacció amb p130^{cas}, proteïna que es troba en el citoplasma i en les adhesions focals controlant la mobilitat cel·lular. L'any 1997 Alvarez i col·laboradors van proposar que la matriu nuclear de l'osteoblast contribuïa al control transcripcional del gen *COL1A1* (Introducció 1.3.2. La matriu extracel·lular). Aquests autors van identificar regions del promotor del *COL1A1* de rata on s'unien dues proteïnes de la matriu nuclear dels osteoblasts: NMP3 i NMP4. En concret, la proteïna NMP4 s'unia, a través del solc menor del DNA, a dues regions riques en timines anomenades *site A* (important en la regulació del gen *in vitro*) i *site B* (important en la regulació del gen *in vivo*) (Alvarez i col., 1998). Quan els autors van clonar la proteïna NMP4, aquesta va resultar ser la mateixa proteïna que CIZ (Thunyakitpaisal i col., 2001).

En humans, el gen *CIZ/NMP4*, també anomenat *ZNF384*, es localitza a 12p12-13, i tot i que en un primer moment es va descriure que contenia 10 exons, actualment se n'hi coneixen més (Margolis i col., 1997); (Fig. 17). En ratolí, s'han descrit dos promotors adjacents que no tenen ni caixes TATA ni CCAAT i que donen lloc a dos inicis de transcripció (Alvarez i col., 2005).

CIZ/NMP4 és una proteïna d'expressió ubiqua, però s'ha vist que en rata és més abundant en testicles, cor, fetge, cervell i ronyó (Nakamoto i col., 2000; Thunyakitpaisal i col., 2001). En el teixit ossi adult de rata, *CIZ/NMP4* s'expressa en els osteoblasts, osteòcits i condrocits; i durant el desenvolupament es detecta a partir del 7è dia postcoit i disminueix a partir del dia 17è.

La proteïna *CIZ/NMP4* conté, a l'extrem N-terminal, una cremallera de leucines (LZ), una regió rica en serines (S) i una seqüència rica en prolins (P) de tipus SH3, amb la qual la proteïna de rata, però no la humana, interacciona directament amb la proteïna p130^{cas} (Nakamoto i col., 2000; Torrungruang i col., 2002a; Janssen i Marynen, 2006); (Fig. 17). Just darrera la seqüència de prolins hi ha un senyal de localització nuclear (NLS). El tret més característic de la proteïna són els cinc, sis o vuit dits de zinc (ZNF) del tipus Krüppel (C2H2) amb els quals s'uneix al DNA. A l'extrem C-terminal hi ha un domini ric en glutamines i alanines (QA), que participa en la transactivació.

ZNF384=CIZ/NMP4

12q12-13

22,1 kb

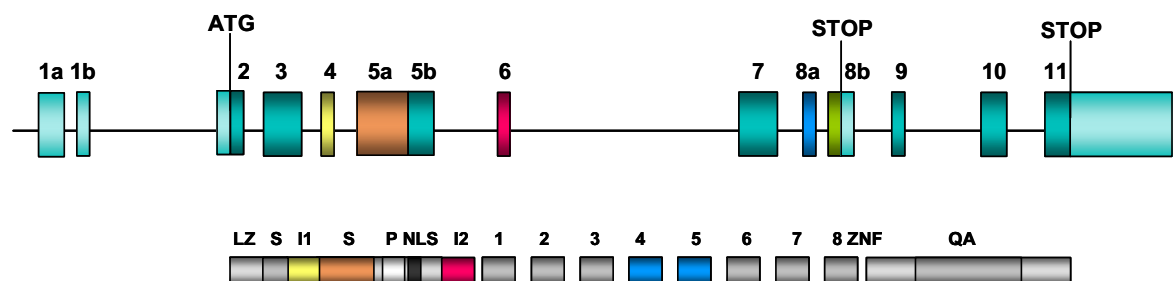


Fig. 17 Estructura gènica i proteica de CIZ/NMP4. El gen pateix *splicing* alternatiu donant lloc a diverses isoformes. La característica principal de la proteïna és la presència de 5, 6 o 8 dits de zinc (ZNF). LZ: cremallera de leucines; S: regió rica en serines; P: regió rica en prolines; QA: regió rica en glutamines i alanines; NLS: senyal de localització nuclear; I1: insert 1 eliminat per *splicing* en algunes isoformes; I2: insert 2 eliminat per *splicing* en algunes isoformes.

En rata s'han identificat diverses isoformes de la proteïna amb pesos moleculars que oscil·len entre 45 i 70 kDa (Nakamoto i col., 2000; Thunyakitpaisal i col., 2001; Torrungruang i col., 2002b). Les isoformes difereixen en la presència o no de dos inserts: I1 i I2. Un altre tret diferencial és el nombre de dits de zinc que presenten: 5, 6 o 8. En rata s'ha detectat la presència simultània de diversos transcrits en teixits de cervell, fetge i ronyó, però un de sol en cor, melsa, pulmons, múscul esquelètic i testicles (Nakamoto i col., 2000). En osteoblasts primaris i cèl·lules d'osteosarcoma de rata també s'han detectat diversos transcrits (Thunyakitpaisal i col., 2001). Totes les isoformes proteiques de CIZ/NMP4 es localitzen al nucli dels osteoblasts (Feister i col., 2000). També s'ha detectat la seva presència en el citoplasma, en els mitocondris, en l'aparell de Golgi i, en alguns casos, en les adhesions focals (Nakamoto i col., 2000; Torrungruang i col., 2002b).

La proteïna CIZ/NMP4 és una molècula implicada en la formació de complexos proteics de gran magnitud (Torrungruang i col., 2002a). A través de la creació aquests complexos pot doblegar el DNA i reorganitzar-ne l'estructura (Alvarez i col., 1998; Bidwell i col., 2001). CIZ/NMP4 s'uneix a seqüències del tipus 5'-G/CAAAA(A)-3'.

CIZ/NMP4 estimula la transcripció dels gens de les metaloproteïnases (MMPs), proteïnes dependents de metall encarregades de degradar la matriu extracel·lular tant d'osteoblasts com de condrocits (Nakamoto i col., 2000; Shah i col., 2004; Fan i col., 2006). Les isoformes 11H i 21H també són capaces d'autoregular positivament la transcripció de CIZ/NMP4 (Alvarez i col., 2005).

El paper que juga CIZ/NMP4 en la regulació del gen *Col1a1* és controvertit i varia segons les condicions en què s'ha realitzat l'estudi. Mentre que alguns estudis han mostrat que CIZ/NMP4 estimula l'expressió del gen *Col1a1* (Furuya i col., 2000), altres han trobat que l'inhibeix (Thunyakitpaisal i col., 2001). Finalment altres autors han descrit tant un efecte estimulador com repressor de CIZ/NMP4 sobre el gen *Col1a1* dependent de les condicions a les quals estaven sotmeses les cèl·lules. Quan es sobreexpressava CIZ/NMP4 augmentava lleugerament el nivell del mRNA del *Col1a1*. En canvi, quan a més de sobreexpressar-se CIZ/NMP4, es tractaven les

cèl·lules amb BMP2, CIZ/NMP4 no tant sols no estimulava el *Col1a1* sinó que inhibia l'efecte estimulador induït per la BMP2 (Shen i col., 2002). Es va veure que la inhibició de la via de la BMP2 per part de CIZ/NMP4 tenia lloc a nivell de les Smad1 o 5 (Introducció 4.2.2. BMP2).

En explorar el rol fisiològic de la proteïna CIZ/NMP4 mitjançant la creació d'un ratolí *knock out*, es va observar que aquests ratolins tenien un major volum ossi i un major índex de formació d'os, mentre que l'índex de resorció no estava alterat (Morinobu i col., 2005). També presentaven una major expressió de marcadors osteoblàstics com el col·lagen. Les cèl·lules de la medul·la òssia procedents del fèmur d'aquests ratolins, tenien una major activitat de l'ALP i una major capacitat de formació de nòduls de mineralització respecte les cèl·lules dels ratolins controls. Quan aquestes cèl·lules es tractaven amb BMP2 augmentava l'activitat de l'ALP tant en les cèl·lules control com en les procedents del *knock out*, però en aquest darrer cas l'augment era considerablement major. Després d'ablacionar l'os *in vivo*, es va veure que els ratolins *Ciz/Nmp4^{-/-}* desenvolupaven os nou més fàcilment que els controls, i responien millor al tractament amb BMP2. Per tant es pot concloure que, *in vivo*, CIZ/NMP4 disminueix els nivells de massa òssia en els adults a través de la supressió de l'estímul de formació d'os promogut per la BMP2. També s'ha vist que la deficiència de *Ciz/Nmp4* frena la pèrdua d'os deguda al desús, és a dir, deguda a la falta de pressió mecànica que estimula la formació d'os (Hino i col., 2007). El desenvolupament embrionari correcte d'aquests ratolins junt amb una menor pèrdua d'os en condicions de desús, fa pensar que la funció de CIZ/NMP4 es centra exclusivament en l'adult. Per tot això CIZ/NMP4 és una proteïna interessant a tenir en compte en estudiar l'osteoporosi.

4.2.2. BMP2

Les proteïnes morfogèniques de l'os (Bone Morphogenic Proteins o BMPs) són factors de creixement multifuncionals de la superfamília TGF β . Com la resta de proteïnes de la superfamília TGF β , les BMPs són sintetitzades com a molècules precursors, que per ser actives han de ser processades i han de dimeritzar a través de ponts disulfur (revisat per Granjeiro i col., 2005). Poden actuar com a homodímers o heterodímers. Actualment es coneixen més de 40 BMPs.

Les BMPs intervenen en el desenvolupament embrionari i en multitud de funcions cel·lulars postnatales i de l'adult (revisat per Chen i col., 2004). Tot i la gran diversitat de funcions, les BMPs són anomenades així perquè als anys seixanta es van identificar en la matriu òssia desmineralitzada i es va observar que eren capaces d'induir la formació d'os ectòpic (Urist i Strates, 1971).

Aquestes molècules participen en el desenvolupament embrionari de l'esquelet craniofacial, axial i de les extremitats (revisat per Wan i Cao, 2005). Les BMPs indueixen la diferenciació de les cèl·lules mesenquimàtiques cap al llinatge osteoblàstic i estimulen la formació del cartílag (revisat per Granjeiro i col., 2005). *In vitro*, petites concentracions de BMP2 diferencien les cèl·lules mesenquimàtiques cap a adipòcits, mentre que altes concentracions les diferencien cap a condrocits i osteoblasts (Wang i col., 1993). En preosteoblasts i osteoblasts, les BMPs

estimulen l'activitat osteoblàstica: augmenten la proliferació, augmenten la síntesi de col·lagen i d'osteocalcina i també augmenten l'activitat de l'ALP. Malgrat que les BMPs i el TGF β 1 promouen la diferenciació dels osteoblasts, les seves accions no s'encavalquen. Mentre que el TGF β 1 actua en els primers estadis de diferenciació i n'inhibeix els últims, les BMPs actuen al final del procés de diferenciació afavorint l'expressió dels marcadors osteoblàstics (Janssens i col., 2005; Ryoo i col., 2006). D'altra banda també s'ha observat que la BMP2 i la BMP4 estimulen la resorció òssia (Kaneko i col., 2000).

En la majoria dels casos, la disrupció en homozigosi dels gens de les BMPs, dels seus receptors o de la cascada de senyalització, és letal (Chen i col., 2004). En la natura mutacions en aquest sistema han estat relacionades amb problemes esquelètics.

Degut a la seva capacitat formadora d'os, la BMP2 ha estat proposada com una possible teràpia per a l'osteoporosi i per a altres patologies òssies (Chen i col., 2004; Granjeiro i col., 2005). En models de ratolí s'ha observat que l'administració de BMP2 recombinant humana (rhBMP2) incrementa l'activitat de les cèl·lules precursors i evita la pèrdua d'os deguda a l'edat i a la depleció estrogènica (Turgeman i col., 2002). Aquesta molècula també s'ha utilitzat amb èxit per substituir els empelts ossis en cirurgia.

Tots els membres de la superfamília TGF β utilitzen un sistema dual de receptors de membrana serina/treonina quinases de tipus I i de tipus II (revisat per Feng i Derynck, 2005). Els receptors tipus II presenten activitat quinasa constitutiva i els de tipus I presenten un domini citoplasmàtic anomenat GS, ric en glicines i serines. En mamífers s'han descrit 7 receptors de tipus I, i 5 de tipus II. En absència de lligand, els receptors de tipus I i de tipus II es troben en forma d'homodímers. Un cop s'uneix el lligand, es forma un complex heterotetramèric. En funció del lligand, els receptors que intervenen en el complex són uns o bé uns altres (Fig. 18A). Quan el lligand s'uneix, el receptor de tipus II fosforila el domini GS del receptor de tipus I, el qual senyalitza a través de la via de les MAPK o a través de la via de les Smad (revisat per Janssens i col., 2005); (Fig. 18B).

Els gens *Smad* de vertebrats són homòlegs als gens *Sma* de *C. elegans* i als gens *Mad* de *D. melanogaster* (Feng i Derynck, 2005; Miyazono i col., 2005). Existeixen tres grups de Smads: les R-Smads (2, 3, 1, 5 i 8) que funcionen com a reguladores dels receptors, les I-Smads (6 i 7) que funcionen com a inhibidores i les Co-Smads que funcionen com a cooperants (4). El receptor I activat fosforila les R-Smads que canvien de conformació, s'alliberen del receptor i formen un heterocomplex amb les Co-Smads. Aquest complex es transloca al nucli i allà pot unir-se directament al DNA, pot interaccionar amb factors de transcripció o bé pot reclutar coactivadors o corepressors. Quan les Smads s'uneixen al DNA ho fan en seqüències del tipus SBEs [5'-GTCTAGAC-3' (Smad3)] o bé en regions riques en GCs. L'afinitat d'unió al DNA de les Smads és baixa, de manera que en molts casos la regulació transcriptional es produeix a través de la unió a factors de transcripció, els quals són els que s'uneixen directament al DNA (revisat per Ryoo i col., 2006).

La cascada de senyalització a través de les BMPs disposa d'una sèrie de mecanismes de regulació negativa entre els quals destaquen els antagonistes del lligand (noggin i chordin), les I-

Smad (6 i 7), la proteïna Tob o la proteïna Smurf (Chen i col., 2004; Miyazono i col., 2005). Com hem comentat anteriorment, CIZ/NMP4 actua com a regulador negatiu de les Smads activades per BMP2 (Shen i col., 2002).

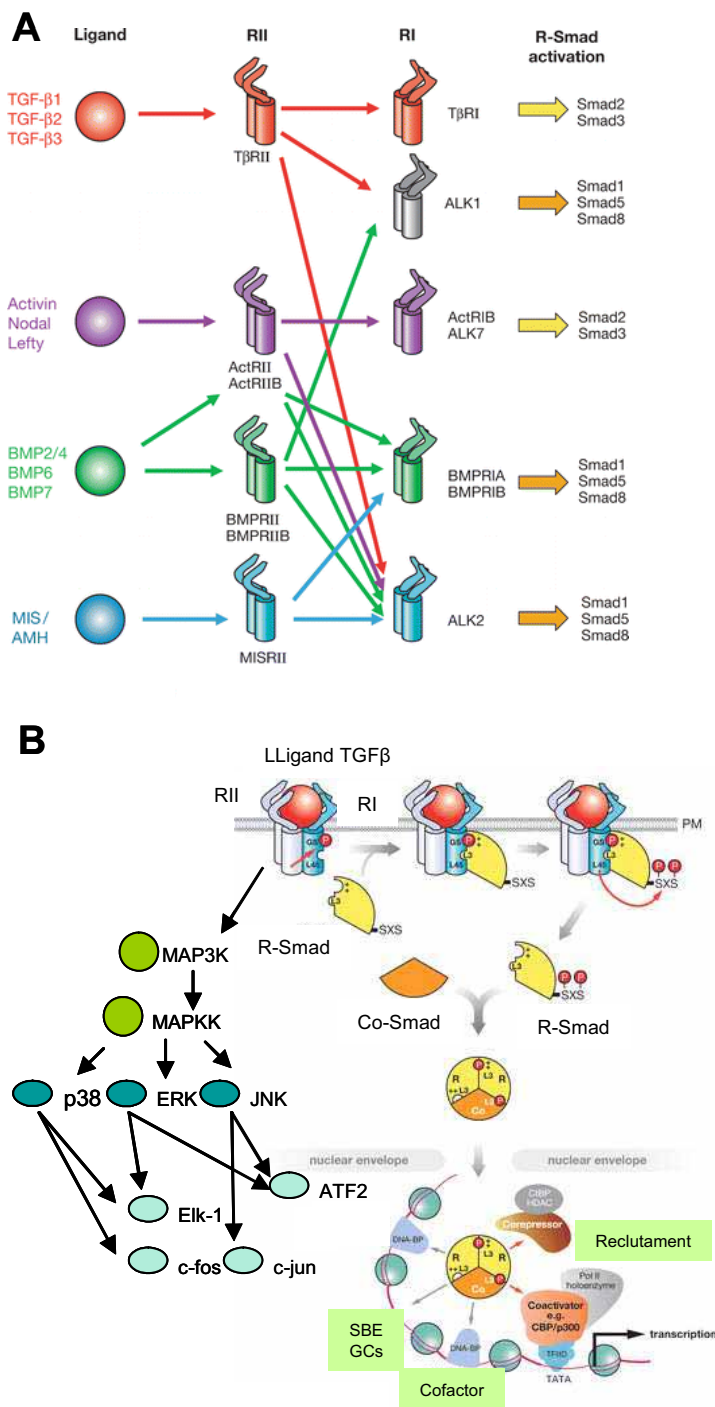


Fig. 18 Receptors i cascada de senyalització de la BMP2 **A.** Lligands i receptors de tipus I i de tipus II de la superfamília TGF β . El senyal de TGF β 1 es transmet mitjançant els complexos de receptors indicats en vermell en la figura. En la senyalització de BMP2 intervenen majoritàriament els complexos indicats en verd. En funció del lligand, diferents Smads participen en la senyalització. TGF β 1 senyalitza principalment a través de les R-Smad 2 i 3, mentre que BMP2 mobilitza les R-Smad 1, 5 i 8. **B.** Cascada canònica de senyalització de la superfamília TGF β a través de les proteïnes Smad i de la via de les MAPK (adaptat de Feng i Derynck, 2005; Janssens i col., 2005).