

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Programa de Doctorado de Biotecnología**



**IDENTIFICACIÓN DE GENES Y  
POLIMORFISMOS ASOCIADOS A  
FENOTIPOS ÓSEOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Layla Panach González**

**Dirigida por el Doctor Miguel Ángel García Pérez y el Doctor  
Antonio Cano Sánchez**

**Valencia, julio de 2017**



**D. Antonio Cano Sánchez**, Jefe de Sección del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

**D. Miguel Ángel García Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia e investigador del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Dña. Layla Panach González**, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral titulada “Identificación de polimorfismos y genes asociados a fenotipos óseos” para la obtención del título de doctora en el Programa de Doctorado de Biotecnología de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 12 julio de 2017.

Fdo. D. Antonio Cano Sánchez

Fdo. D. Miguel Ángel García Pérez

Fdo. Dña. Layla Panach González





Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a la financiación del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del **Ministerio de Educación, Cultura y Deporte**.

Los experimentos han sido financiados por los proyectos:

PI09/00184; PI12/02582; PI12/02775 del **Instituto de Salud Carlos III**:

Co-financiados con fondos **FEDER**.

Experimentos realizados en las instalaciones de la **Universidad de Valencia** y el **Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA**.



UNIÓN EUROPEA  
"Una manera de hacer Europa"





## Agradecimientos

Resulta muy complicado comprimir el agradecimiento de más de cinco años en unas pocas palabras, y aunque he intentado verbalizarlo en el día a día quiero que quede constancia de que éste ha sido un trabajo en equipo, y que no hubiera sido capaz de llevarlo a cabo sin cada uno de vosotros.

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mis directores de Tesis la confianza y el apoyo que me han brindado en toda esta etapa. Al Dr. Cano quiero agradecerle la oportunidad de trabajar en su laboratorio y las facilidades que me ha proporcionado para llevar a cabo el trabajo y al Dr. García, a Miguel Ángel, le tengo que agradecer prácticamente cada coma de esta tesis, pues finalmente sí ha sido más larga que una pascua, pero la he conseguido sacar adelante gracias a él. Independientemente de este trabajo, le agradezco esta experiencia que me ha hecho crecer profesionalmente, enseñándome cosas de mí misma que no sabía que era capaz de sacar adelante, pero sobre todo personalmente, porque me ha enseñado lo más bonito que se puede enseñar, a creer en mí y a valorarme, por todo, mil gracias.

Uno de los agradecimientos más especiales lo quiero dedicar a mis AMIGOS del laboratorio (Rosa, Gema, Begoña, Vicky, Ximo, Daznia, Rafa y un largo etcétera). Gracias a todas y cada una de las personas que han pasado por el laboratorio en estos años me he convertido en quien soy, pues todos, a vuestra manera me habéis enseñado algo de la ciencia (y de la pa-ciencia). Decir que me habéis ayudado en este trabajo sería quedarme muy corta, gracias por apoyarme en cada paso y aportarme vuestra experiencia, entusiasmo y ánimo a cambio de nada, en especial a Rosa, Vicky y Ximo, que han sido un sueño de técnicos, la suerte más grande que podría haber tenido.

En otro plano tengo que agradecer a todas aquellas personas que forman parte de mi vida que, aún en muchos casos sin entender demasiado bien lo que hago, se han preocupado por cómo iba mi trabajo, apoyándose en cada etapa con sus mejores deseos, gracias Paola, Rebeca, Paula, Marta, Encarna, Eva... (Estos puntos suspensivos son los más largos del mundo, gracias a cada persona que se ha preocupado por cómo iba este trabajo).

Gracias a Jose, porque aguantar el día a día de un doctorando no es nada fácil y yo soy muy consciente de lo insoportable que he llegado a ser. Gracias por empujarme a seguir y apoyarme para que creyera en mí. Sé que sientes

este proyecto como algo un poco tuyo, y es que debes tener claro que si he podido terminarlo ha sido gracias a ti, y que éste es solo el primero de tantos proyectos juntos. Gracias por ser quien eres y hacerme tan feliz.

Y por último a mi familia, mi hermana Claudia y especialmente mis padres, les quiero agradecer el haberme dado todas las oportunidades que he necesitado para llegar hasta aquí, el esfuerzo invertido en mí futuro y el hacer de mí quién soy hoy, apoyándome y también aguantándome en mis malos momentos, por esto y por todo lo demás os estaré siempre agradecida.

# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>23</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1. Fisiología del hueso .....</b>	<b>29</b>
1.1.1. Estructura y funciones del tejido óseo.....	29
1.1.1.1. Composición del hueso.....	31
1.1.2. Remodelado óseo .....	35
1.1.2.1. Regulación del remodelado óseo .....	36
1.1.2.2. Marcadores bioquímicos del remodelo óseo .....	37
<b>1.2. Principales rutas y vías de señalización en la homeostasis ósea.....</b>	<b>40</b>
1.2.1. Regulación sistémica.....	40
1.2.1.1. Ruta endocrina del estrógeno.....	40
1.2.2. Regulación en el microambiente óseo .....	43
1.2.2.1 Sistema RANK/RANKL/OPG .....	45
1.2.2.2. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina.....	47
<b>1.3. Regulación del metabolismo óseo por el sistema inmune: Osteoinmunología .....</b>	<b>49</b>
1.3.1. Función del sistema CD40/CD40L en la regulación del metabolismo óseo .....	50
1.3.2. Papel de la célula T en la homeostasis ósea .....	51
1.3.3. Papel de la célula B en la homeostasis ósea .....	52
<b>1.4. Caracterización del estado óseo. Fenotipos estudiados .....</b>	<b>52</b>
1.4.1. Osteoporosis .....	56
1.4.1.1. Osteoporosis postmenopáusica.....	57
1.4.2. Fractura por fragilidad.....	58
<b>1.5. Genética de la osteoporosis y de la fractura ósea.....</b>	<b>59</b>
1.5.1. Estudios de asociación genética .....	60
1.5.1.1. Estudios de gen candidato .....	61
1.5.1.2. GWAS .....	61
1.5.1.3. Importancia de la replicación en los estudios de asociación genética.....	63
1.5.2. Regulación epigenética en la homeostasis ósea .....	64
1.5.3. Caracterización funcional de las variantes genéticas asociadas a DMO .....	69

---

<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. Poblaciones de estudio .....</b>	<b>77</b>
3.1.1. Cohorte DMO.....	78
3.1.2. Cohorte Fractura.....	80
<b>3.2. Caracterización del estado bioquímico, antropométrico y óseo de las cohortes .....</b>	<b>81</b>
3.2.1. Datos obtenidos del laboratorio central de Bioquímica Clínica .....	82
3.2.2. Obtención de muestras .....	83
A) Obtención de ADN.....	84
B) Obtención de ARN .....	84
3.2.3. Determinación de citoquinas .....	86
3.2.4. Determinaciones densitométricas.....	89
<b>3.3. Estudios celulares.....</b>	<b>91</b>
3.3.1. Manejo cultivos celulares.....	91
3.3.2. Líneas celulares comerciales .....	91
3.3.2.1. Saos-2 .....	91
3.3.2.2. Hela.....	92
3.3.2.3. MC3T3-E1 .....	93
3.3.3. Líneas celulares primarias .....	94
3.3.3.1. Osteoblastos humanos .....	94
A) Obtención y mantenimiento de los osteoblastos primarios.....	95
B) Comprobación de la pureza de los cultivos de osteoblastos primarios .....	96
3.3.3.2. Médula ósea completa, bazo y células B aisladas de ratón.....	97
<b>3.4. Estudios de expresión génica.....</b>	<b>98</b>
3.4.1. Retrotranscripción .....	98
3.4.2. Ensayos de expresión génica por PCR a tiempo real .....	99
3.4.3. Ensayos de expresión génica mediante microarrays .....	100
3.4.4. Ensayos de expresión génica mediante Espectrometría de masas Maldi-TOF (Sequenom).....	101
<b>3.5. Identificación de nuevos genes candidatos mediante estudios funcionales .....</b>	<b>103</b>
3.5.1. Ensayos traslaciones a partir de un modelo animal .....	103
3.5.1.1. Ovariectomía como modelo de pérdida ósea acelerada.....	104
A) Inmunopurificación magnética de células B a partir de médula ósea total.....	107



B) Inmunofenotipo celular mediante citometría .....	109
<b>3.6 Diseño y ejecución de un estudio de asociación genética .....</b>	<b>109</b>
3.6.1. Selección de sujetos, genes y polimorfismos .....	110
3.6.1.1. Elección de SNPs en nuestros estudios.....	112
A) Replicación de estudios de asociación .....	112
B) Identificación de nuevos polimorfismos asociados a DMO mediante estudios funcionales .....	114
3.6.2. Genotipado por sondas Taqman .....	119
3.6.3. Genotipado mediante espectrometría de masas Madi-TOF (Plataforma Sequenom).....	122
<b>3.7. Estudios de funcionalidad de las variantes genéticas .....</b>	<b>123</b>
3.7.1. Identificación de una expresión génica dependiente de alelo (EGDA) .....	123
3.7.1.1. Cuantificación de la EGDA mediante secuenciación .....	124
3.7.1.2. Cuantificación de la EGDA mediante qPCR .....	125
3.7.1.3. Caracterización de la tasa de transcripción mediante ensayos de gen reportero .....	125
A) Obtención de las construcciones .....	126
B) Transfección y medida de la actividad luciferasa .....	131
3.7.2. Cuantificación del grado de metilación de islas CpG en regiones promotoras.....	133
3.7.3. Papel del sistema CD40/CD40L en la producción de osteoprotegerina (OPG).....	135
3.7.3.1. Estudios en modelo animal .....	135
3.7.3.2. Estudio del efecto de un anticuerpo activador de CD40 sobre la producción de OPG en varios modelos celulares .....	139
<b>3.8. Expresión diferencial de micro-RNAs en la fractura ósea .....</b>	<b>142</b>
3.8.1. Primera fase: Elaboración del perfil .....	143
3.8.1.1. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y controles de calidad.....	143
3.8.1.2. Análisis de la expresión diferencial de miRNAs .....	144
3.8.2. Segunda fase: Validación del perfil.....	145
<b>3.9. Análisis estadístico .....</b>	<b>146</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
<b>4.1. Replicación de estudios de asociación .....</b>	<b>151</b>
4.1.1. Replicación de asociaciones halladas en otras cohortes.....	151

4.1.2. Ampliación de estudios propios .....	155
<b>4.2. Identificación de nuevos genes candidatos a la asociación a DMO.....</b>	<b>163</b>
4.2.1. Ensayos traslaciones a partir de un modelo animal .....	163
4.2.1.1. Análisis del perfil de expresión génica de la médula ósea de la ratona OVX.....	163
4.2.1.1.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos ( <i>GPX3</i> , <i>IRAK3</i> , <i>IL7R</i> y <i>CD79A</i> ) .....	169
4.2.1.2. Análisis del perfil de expresión génica de la célula B tras la OVX .....	174
4.2.1.2.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos ( <i>CD80</i> , <i>CD86</i> , <i>SOX4</i> , <i>IL18</i> , <i>SOX6</i> , <i>TNFRSF19</i> , <i>HDAC5</i> , <i>TYROBP</i> y <i>MMP9</i> ).....	183
4.2.2. Ensayo traslacional a partir de un modelo celular: Análisis del perfil de expresión génica de la fractura por fragilidad .....	186
4.2.2.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos ( <i>MEF2C</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>FOXCl</i> y <i>EBF2</i> ) .....	190
<b>4.3. Estudios de funcionalidad de las variantes génicas.....</b>	<b>194</b>
4.3.1. Identificación de una posible expresión génica dependiente de alelo (EGDA): <i>CD40/CD40L</i> .....	194
4.3.2. Caracterización de la tasa de transcripción mediante ensayos de gen reportero .....	200
4.3.2.1. <i>RUNX2</i> .....	200
4.3.2.2. <i>CD79A</i> .....	202
4.3.2.3. <i>CD40</i> .....	203
4.3.3. Cuantificación del grado de metilación de islas CpG en la región promotora del gen <i>CD40</i> .....	205
<b>4.4. Papel del sistema <i>CD40/CD40L</i> en la producción de OPG.....</b>	<b>211</b>
4.4.1. Estudios en modelo animal.....	211
4.4.2. Estudios en modelos celulares.....	214
<b>4.5. Caracterización de la fractura por fragilidad e identificación de nuevos biomarcadores indicadores del riesgo de fractura osteoporótica.....</b>	<b>220</b>
4.5.1. Perfil antropométrico, densitométrico y de metabolismo óseo de la fractura por fragilidad.....	220
4.5.2. Identificación de nuevos biomarcadores predictores del riesgo de fractura: Estudio de miRNAs en la fractura ósea .....	224
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>237</b>

<b>5.1. Identificación de nuevos genes candidatos a la asociación a DMO.....</b>	<b>239</b>
5.1.1. Replicación de asociaciones halladas en otras cohortes y ampliación de estudios propios .....	240
5.1.2. Estudios traslacionales a partir de modelos animales y celulares ..	246
5.1.3. Estudio de la funcionalidad de las variantes genéticas.....	258
<b>5.2. Papel del sistema CD40/CD40L en la homeostasis ósea y su implicación en la producción de OPG por parte de la célula B en médula ósea .....</b>	<b>263</b>
<b>5.3. Caracterización e identificación de nuevos biomarcadores indicadores del riesgo de fractura por fragilidad .....</b>	<b>265</b>
<b>5.4. Limitaciones .....</b>	<b>273</b>
<b>5.5. Perspectivas futuras.....</b>	<b>276</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>279</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>285</b>
<b>8. PUBLICACIONES.....</b>	<b>307</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>359</b>



# ABREVIATURAS



**μl:** microlitro  
**μM:** micromolar  
**5mC:** citosina del carbono 5  
**ADM:** años desde la menopausia  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN complementario  
**ADNg:** ADN genómico  
**ANCOVA:** análisis de la covarianza  
**ANOVA:** análisis de la varianza  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ARNc:** ARN complementario  
**ARNm:** ARN mensajero  
**AUC (Area Under Curve):** área bajo la curva  
**BCR (B-cell receptor):** receptor de la célula B  
**BMP (bone morphogenetic proteins):** proteínas morfogénicas del hueso.  
**CDK-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration**  
**CF:** cuello femoral  
**CL:** columna lumbar  
**CL-DMO:** densidad mineral ósea en columna lumbar  
**cm<sup>2</sup>:** centímetro cuadrado  
**col.:** colaboradores  
**Ct (Cycle threshold):** ciclo umbral  
**CTx:** segmento carboxi-terminal del colágeno (C-telopéptido)  
**CV:** coeficiente variación  
**dbSNP:** base de datos de SNPs  
**DE:** desviación estándar  
**DEPC** Dietil Pirocarbonato  
**DMO:** Densidad Mineral Ósea  
**DMOe:** Densidad Mineral Ósea estandarizada.  
**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato  
**DXA:** Absorciometría dual de rayos X  
**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**EE:** error estándar  
**EEUU:** Estados Unidos  
**EGDA:** Expresión Génica Dependiente de Alelo  
**eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate):** tasa estimada de filtrado glomerular  
**ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay):** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
**FA:** fosfatasa alcalina  
**FAO:** fosfatasa alcalina ósea  
**FDR (False Discovery Rate):** Tasa de falsos positivos

**FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*): transferencia de energía entre fluorocromos

**FSC**: *Forward scatter*

**FSH** (*Follicle-stimulating hormone*): Hormona folículo-estimulante

**g**: gramo

**GWAS** (*Genome-wide association study*): estudio de asociación de genoma completo.

**h**: hora

**HDL** (*High Density Lipoprotein*): Lipoproteína de alta densidad

**HWE** (*Hardy-Weinberg Equilibrium*): equilibrio de Hardy-Weinberg

**ICTP**: telopéptido C-terminal del colágeno tipo

**IL**: interleuquina

**IMC**: Índice de Masa Corporal

**INF $\gamma$** : interferón gamma

**kb**: kilobase

**kg**: kilogramo

**LB**: Medio de cultivo Luria-Broth

**LDA**: Análisis de discriminación lineal

**LDL** (*Low Density Lipoprotein*): Lipoproteína de baja densidad

**m<sup>2</sup>**: metro cuadrado

**MAF** (*Minor Allele Frequency*): Frecuencia del alelo menor

**MALDI-TOF**: (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*)

**M-CSF**: Factor estimulador de colonias de macrófagos

**mg**: miligramo

**MHC**: molécula de histocompatibilidad

**min**: minuto

**miRNA**: micro-ARN

**mM**: milimolar

**MO**: médula ósea

**MOG**: medio osteoblastogénico

**MPM**: Marcador peso molecular

**N<sub>2</sub>**: Nitrógeno

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information

**ng**: nanogramo

**nm**: nanómetro

**NTx**: segmento amino-terminal del colágeno (N-telopéptido)

**OB**: osteoblasto

**OC**: osteoclasto

**OPG**: osteoprotegerina

**OR**: *Odds ratio*

**OSX**: Osterix

**OTP**: Osteoporosis



**OVX:** ovariectomía, ovariectomizado  
**p.e.:** por ejemplo  
**p.h.** post-hoc  
**P/E:** penicilina/estreptomicina  
**Pb:** pares de bases  
**PBLs** (*Perypheral blood leucocytes*): leucocitos de sangre periférica  
**PBS:** Phosphate-buffered saline  
**PCA** (*Principal Components Analysis*): Análisis de componentes principales  
**PCR** (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa  
**PCR:** Proteína C Reactiva  
**PE** (*phycoeritrin*): ficoeritrina  
**pg/ml:** picogramos/mililitro  
**PHA:** fitohemaglutinina  
**PICP:** segmento carboxi-terminal de procolágeno  
**PINP:** segmento amino-terminal de procolágeno  
**Pre-miRNA:** miRNA precursor  
**Pri-miRNA:** miRNA primario  
**PTH:** hormona paratiroidea intacta  
**qPCR:** PCR cuantitativa  
**RANK:** receptor activador de NF-kB  
**RANKL:** ligando de RANK  
**RIN** (*RNA Integrity Number*): Número de integridad del ARN  
**RISC** (*RNA-induced silencing complex*): Complejo de silenciamiento inducido por ARN.  
**RM:** resonancia magnética  
**ROC:** *Receiver Operating Characteristic*  
**RT:** retrotranscripción  
**SBF:** suero bovino fetal  
**SHAM:** falsamente intervenido  
**SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*): polimorfismo de nucleótido simple  
**SSC:** *Side scatter*  
**SUFT:** sitio de unión de un factor de transcripción  
**TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta  
**TH:** Terapia Hormonal  
**Tm:** Temperatura *melting* o fusión  
**TNF:** Factor Necrosis Tumoral  
**TRAP:** fosfatasa ácida tartrato-resistente  
**U:** unidades  
**UE:** Unión Europea  
**UTR** (*Untranslated región*): Región no traducida del gen  
**v/v:** volumen/volumen



# RESUMEN



El deterioro óseo sucede principalmente como consecuencia del envejecimiento en ambos sexos y particularmente con la depleción estrogénica que ocurre durante la menopausia en la mujer. Este deterioro en la calidad ósea puede desembocar finalmente en el desarrollo de patologías óseas como la osteoporosis, y en última instancia en el fenotipo clínico de peor pronóstico, la fractura ósea por fragilidad. Ambos fenotipos, la osteoporosis y la fractura por fragilidad, se consideran patologías complejas o multifactoriales; esto es, influenciadas por múltiples factores entre los que se encuentran factores genéticos, epigenéticos o ambientales. En la caracterización de los factores genéticos que intervienen en estos fenotipos se han venido utilizando múltiples aproximaciones, cada vez más costosas, pero que, en conjunto, no han llegado a explicar más que un pequeño porcentaje de la varianza fenotípica total observada.

En los últimos años se ha demostrado que la interacción de los sistemas óseo, inmune y hematopoyético trasciende de la de meros compañeros de nicho, pues sus células principales ocupan el mismo espacio-tiempo en la médula ósea, lo que hace posible múltiples interacciones entre ellas. Ésto ha hecho necesaria la creación de una nueva disciplina de estudio, que se ha bautizado como Osteoinmunología.

El objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido la caracterización genética de los fenotipos mencionados y para ello se han realizado distintos abordajes, algunos de ellos muy novedosos.

El abordaje más clásico es el de los estudios de asociación bajo hipótesis previa, también conocidos como estudios de genes candidatos. En el presente trabajo se ha usado esta aproximación y así, se ha intentado la replicación de estudios previos de otros investigadores, pero también se han elegido para su estudio genes candidatos relacionados con la osteoinmunología como *CD40* y *CD40L*. Sin embargo, el presente trabajo no se ha limitado a identificar una posible asociación genética, sino que, además, se ha centrado en intentar determinar la funcionalidad de los polimorfismos, integrando los resultados desde una aproximación global, en la que se pretende abordar el problema

desde una perspectiva traslacional e integradora. Fruto de estos abordajes se ha conseguido corroborar o describir por primera vez la asociación a fenotipos óseos de polimorfismos en los genes *CD40*, *CD40L*, y *LRP5*, entre otros.

Un abordaje novedoso del presente trabajo ha sido el uso de aproximaciones traslacionales desde modelos animales y celulares para la identificación de nuevos genes candidatos para su estudio en nuestra cohorte de mujeres. Así, la aproximación traslacional desde el modelo animal de pérdida ósea acelerada, como es el ratón sometido a ovariectomía, ha aportado nuevos genes candidatos y ha subrayado el papel crucial de la célula B en la regulación de la homeostasis ósea debida al déficit de estrógenos, lo que nos ha servido de modelo de lo que sucede en la menopausia. Por este motivo se ha realizado por primera vez un estudio en el que se ha analizado la expresión génica diferencial mediante *microarrays* entre células B de médula ósea de ratonas ovariectomizadas y SHAM. De esta manera se han asociado por primera vez a fenotipos óseos polimorfismos en los genes *CD80*, *CD86* y *MMP9*. Estos resultados apuntan a que el papel de la célula B en la regulación de la homeostasis ósea no está ni mucho menos esclarecido.

Por último, en el presente trabajo se ha tratado de caracterizar la fractura por fragilidad desde un punto de vista más clínico, mediante la determinación de parámetros clásicos, pero también de novedosas determinaciones de miRNAs séricos, lo que nos ha llevado a describir diversos parámetros que pueden postularse como potenciales biomarcadores del riesgo de fractura como el nivel de fosfato o de HDL o tres miRNAs séricos, en especial miR-21-5p.

# 1. INTRODUCCIÓN



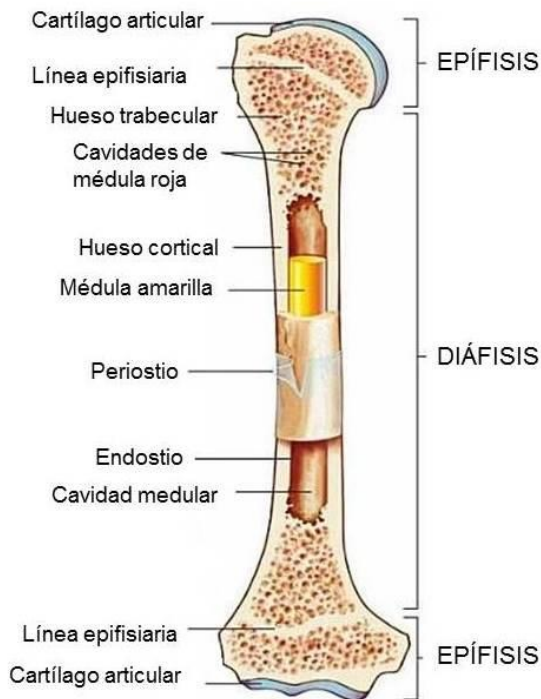


## 1.1 Fisiología del hueso

### 1.1.1 Estructura y funciones del tejido óseo

El esqueleto humano está formado por un total de 213 huesos que pueden clasificarse, según su morfología, en huesos largos, cortos, planos e irregulares.

Los huesos largos presentan dos extremos en forma cónica denominados epífisis, que se encuentran comunicados por la diáfisis, un canal estrecho interno que alberga la cavidad donde se encuentra la médula ósea y una zona de desarrollo entre ambos sectores llamada metafisis. Entre la epífisis y la metafisis se encuentra la placa epifisiaria, que es el cartílago en expansión responsable del crecimiento longitudinal del hueso al calcificarse. Rodeando a la superficie del hueso hay una capa externa denominada periostio, y recubriendo la cavidad medular, una membrana interna denominada endostio (Clarke 2008) (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de un hueso largo.

Atendiendo a la densidad de tejido óseo, que se aprecia tanto a nivel macro como microscópico, se puede establecer una clasificación entre regiones de hueso cortical y hueso trabecular (o hueso esponjoso). El hueso cortical es denso y sólido y constituye la capa dura más externa del hueso, lo que lo hace responsable de la estabilidad esquelética, mientras que el hueso trabecular tiene una estructura de panal formado por placas trabeculares y varillas entrelazadas.

Globalmente, el esqueleto humano está formado por un 80% en masa de hueso cortical y un 20% de hueso trabecular, aunque cada hueso y lugar específico del esqueleto guarda una ratio diferente entre ambos tipos de tejido. La diáfisis se compone de hueso cortical denso, mientras que la metáfisis y las epífisis de los huesos se componen de tejido trabecular rodeado por una capa delgada de tejido cortical denso (Clarke 2008).

El hueso es un órgano firme, duro y resistente, formado por tejido conectivo especializado, que se caracteriza por presentar una matriz extracelular calcificada, lo que le permite llevar a cabo sus funciones fundamentales (Cohen Jr. 2006):

1. Función mecánica: es el componente fundamental del sistema locomotor, sirviendo como apoyo para músculos, tendones y ligamentos.
2. Función protectora: sirve como soporte y protección de órganos blandos, protegiéndolos de traumatismos, además de albergar al sistema hematopoyético (médula ósea).
3. Función metabólica: su matriz mineralizada está compuesta en gran parte por calcio y fósforo, con lo que este tejido actúa como reservorio de minerales. La movilización de estos componentes ayuda a mantener concentraciones séricas normales de estos elementos, y actúa como tampón en el equilibrio ácido base.
4. Función reparadora: se encarga del mantenimiento de la homeostasis ósea, renovando estructuras y reparando fracturas y otros defectos óseos.

### **1.1.1.1 Composición del hueso**

El hueso es un órgano con una alta actividad metabólica, que se compone fundamentalmente por tejido óseo, un tipo de tejido conjuntivo formado por una matriz extracelular y elementos celulares. Las cualidades biomecánicas del hueso dependen de la calidad y organización espacial de estos componentes (Moro *et al.* 2000).

#### **✓ Matriz extracelular**

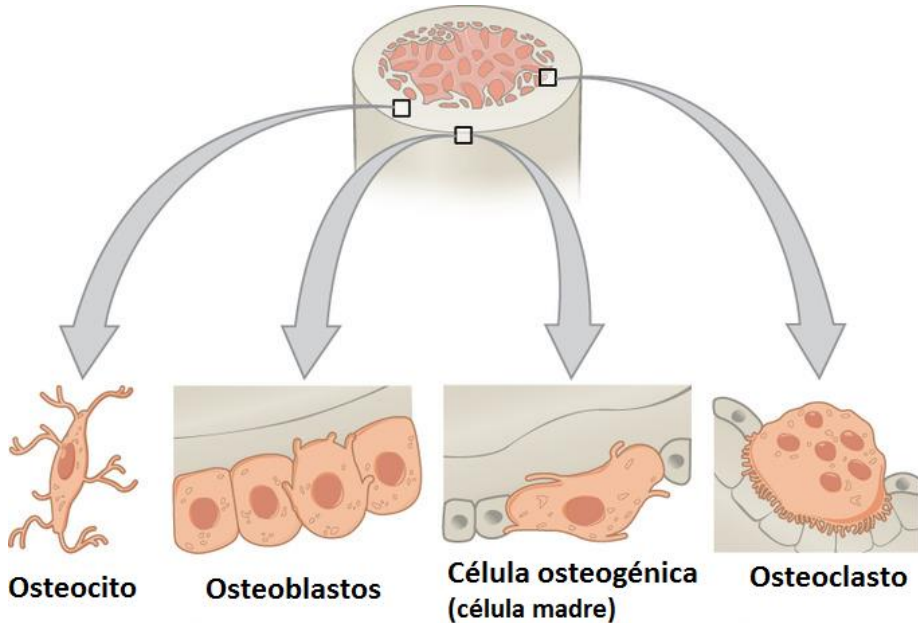
La matriz ósea está formada fundamentalmente por agua, minerales (fracción inorgánica) y gran diversidad de proteínas (fracción orgánica).

La fracción inorgánica está compuesta fundamentalmente por abundantes sales minerales en forma cristalizada, en particular en forma de cristales de hidroxiapatita o fosfato cálcico, carbonato cálcico y pequeñas cantidades de magnesio, flúor y sodio (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.* 2006).

Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, la flexibilidad y resistencia a la tensión se la aportan las fibras de colágeno (sintetizado por parte de los osteoblastos en forma de procolágeno), y otras proteínas no colágenas de la matriz, que desempeñan un papel importante en su calcificación (Young 2003).

#### **✓ Componente celular**

Dado que el tejido óseo es dinámico, necesita mantener su estructura y homeostasis a lo largo de la vida mediante procesos de modelado y remodelado óseo (ver epígrafe 0). Las principales células óseas implicadas en este proceso son los osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento superficial y osteoclastos (Figura 2).



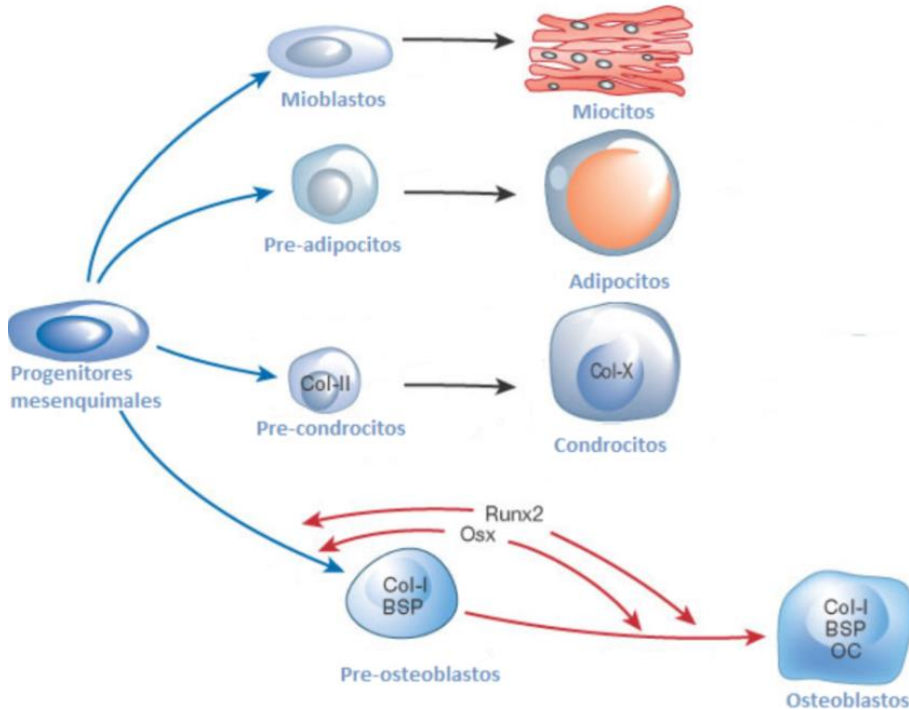
**Figura 2.** Tipos celulares principales del tejido óseo.

- **Osteoblastos**

Los osteoblastos (OBs) son los principales responsables de la formación de hueso mediante la formación de matriz extracelular.

A partir de las células madre mesenquimales se produce una diferenciación hacia la estirpe osteoblástica, condicionada por la presencia de estímulos locales como las proteínas morfogénicas óseas (BMP, *bone morphogenetic proteins*), factores de transcripción como RUNX2 y OSTERIX (Nishimura *et al.* 2012) o las proteínas Wnt (Kubota *et al.* 2009) (Figura 3).

El factor de transcripción RUNX2 induce genes como la fosfatasa alcalina (FA), osteopontina, colágeno, osteocalcina, RANKL o la osteoprotegerina (OPG) (Komori 2010a), que como se verá más adelante forman parte de las principales rutas de regulación en la homeostasis ósea. La acción de los factores de la vía Wnt desencadena una cascada de señalización intracelular que libera  $\beta$ -catenina, inductor final de la transcripción de genes implicados en la osteoblastogénesis (Yavropoulou and Yovos 2007) (ver epígrafe 0).



**Figura 3.** Control transcripcional de la diferenciación osteoblástica. La acción secuencial de los factores de transcripción RUNX2 y Osterix (Osx) es esencial para la diferenciación de los pre-osteoblastos a osteoblastos maduros (modificada de (Harada and Rodan 2003)).

Una vez diferenciados, los OBs se encuentran en la superficie ósea, sintetizando la matriz. Algunas de estas células quedan aisladas, embebidas en su propia matriz, lo que provoca una serie de cambios morfológicos y funcionales que promueven su diferenciación a osteocitos o a célula de revestimiento (Franz-Odenaal *et al.* 2006). De la función de los OBs se desprenden marcadores de formación ósea, lo que constituye una herramienta para la detección del estado de formación de la matriz (ver epígrafe 1.1.2.2).

La diferenciación de células mesenquimales a OB y su posterior maduración a osteocitos cursa con la activación, modulación y supresión de varios genes, y debe darse de forma coordinada y secuencial (Dallas and Bonewald 2010). Cada una de estas fases de diferenciación conlleva cambios profundos en la estructura, fenotipo y función de cada tipo celular.

- **Osteocitos**

Los osteocitos son las células mayoritarias del tejido óseo y conservan la capacidad de sintetizar matriz ósea de los OBs de los que provienen. Además, juegan un papel clave como mecanosensores y reguladores de la homeostasis ósea pues son capaces de emitir prolongaciones digitiformes que se extienden a lo largo de la matriz, lo que les permite contactar con los osteocitos vecinos y los OB de superficie (Rochefort *et al.* 2010).

Las características estructurales de los osteocitos varían según su edad. Un osteocito joven presenta características similares al OB, aunque ha sufrido una reducción de volumen, así como una disminución de los orgánulos encargados de la síntesis de proteínas. Sin embargo, un osteocito más viejo presenta, además de una reducción más drástica de estas estructuras, una acumulación de glucógeno en el citoplasma (Knothe *et al.* 2004; Hadjidakis and Androulakis 2006).

- **Células de revestimiento**

Las células de revestimiento presentan una forma aplanada y se disponen en forma de monocapa sobre superficies óseas inactivas recubiertas por matriz colágena no calcificada que ellas mismas sintetizan. Estas células de revestimiento tienen función de protección de las superficies óseas.

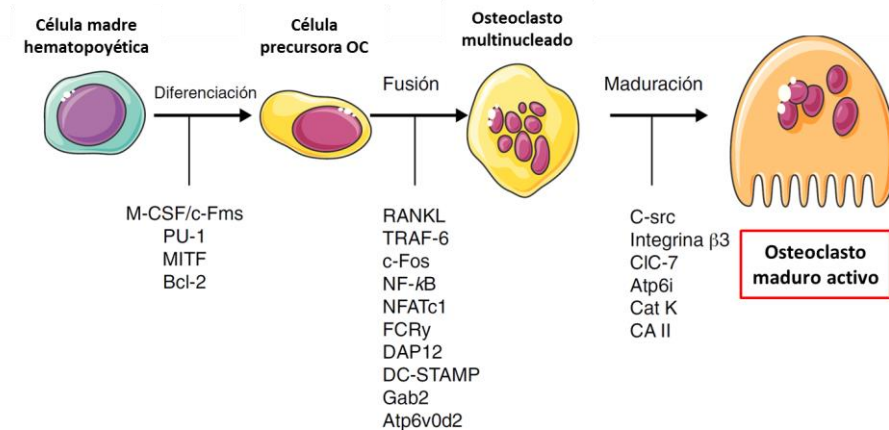
Además, las células de revestimiento son capaces de sintetizar colagenasa que degrada parcialmente la matriz para ayudar al proceso de resorción por parte del osteoclasto y reinician la formación de hueso depositando una capa de matriz colágena no mineralizada (Manolagas 2000).

- **Osteoclastos**

Los osteoclastos (OCs) son las células encargadas de la resorción ósea. Son células multinucleadas de gran tamaño, debido a la gran cantidad de vacuolas que presentan en su citoplasma que utilizan para su función de degradación mediante el bombeo de protones y acidificación del medio (Väänänen *et al.* 2000). Este proceso de disolución de la matriz ósea libera a la circulación muchos productos procedentes de la degradación de la matriz

ósea. Estos productos se utilizan clínicamente como medidas indirectas de la resorción ósea en los seres humanos (ver epígrafe 1.1.2.2).

Los OC provienen de células madre hematopoyéticas (Figura 4), concretamente de precursores del linaje monocito-macrófago (Boyle *et al.* 2003). Para su diferenciación es necesaria la presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de RANKL (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*), sintetizado por las células madre mesenquimales. La acción conjunta de estas dos proteínas atrae a las células madre permitiéndoles proliferar y expresar en la superficie celular el receptor RANK (receptor activador de NF- $\kappa$ B), un factor clave para la diferenciación del osteoclasto al interactuar con RANKL (ver epígrafe 1.2.2.1) (Raggatt and Partridge 2010).



**Figura 4.** Control molecular que se lleva a cabo en cada etapa de la diferenciación del linaje osteoclástico. [Modificada de (Arbolea and Castañeda 2013)].

### 1.1.2 Remodelado óseo

El tejido óseo presenta una gran actividad metabólica y secretora y se encuentra en continuo proceso de remodelado. Entendemos por remodelado óseo el proceso por el cual el tejido viejo microdañado es reemplazado por hueso nuevo mecánicamente resistente a fin de preservar la fortaleza del tejido, adaptándolo al cambio en fuerzas biomecánicas (Manolagas 2000; Clarke 2008).

### **1.1.2.1 Regulación del remodelado óseo**

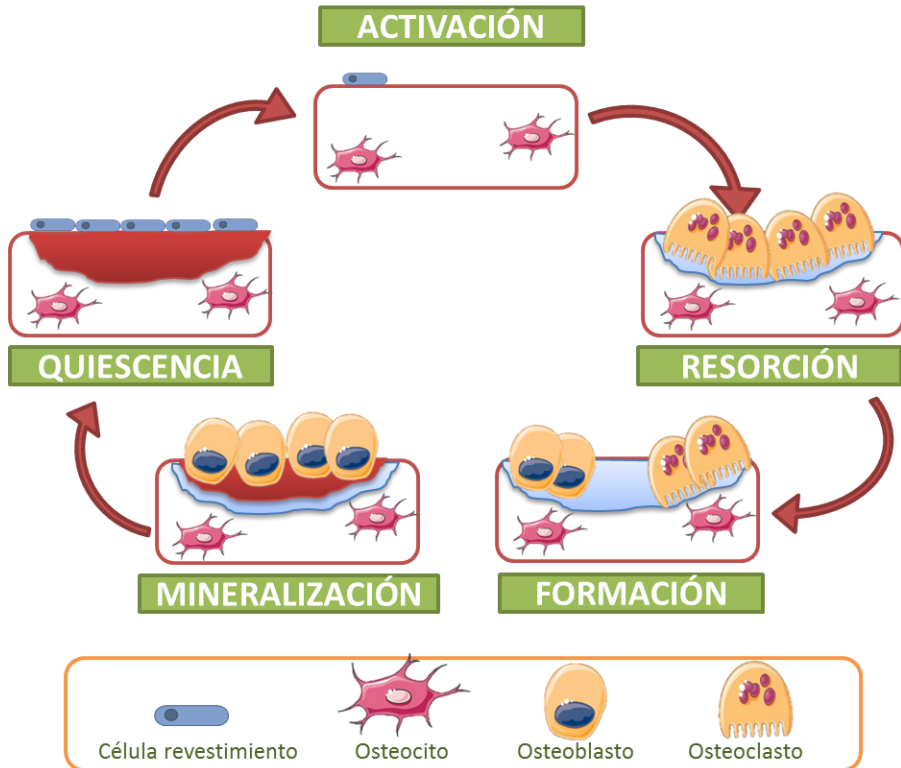
Este proceso se lleva a cabo por grupos de osteoclastos y osteoblastos que se coordinan en las llamadas “unidades multicelulares básicas” donde trabajan de manera balanceada.

Aunque los OBs y OCs han sido los actores principales en el remodelado óseo, en los últimos años se ha descubierto el rol crucial que los osteocitos ejercen en la regulación de este proceso. Éstos actúan como sensores del remodelado detectando dónde es necesaria la resorción y produciendo diversos factores que determinan dónde debe producirse la activación de los precursores osteoclasticos, lo que desencadena el remodelado óseo (Bonewald 2011; Khosla *et al.* 2012).

Brevemente, el remodelado comienza cuando los pre-OCs activados se diferencian a OCs funcionales y comienza la fase de resorción de un pequeño volumen de tejido. Después, los OCs mueren por apoptosis y los OBs son atraídos a la zona y rellenan la zona erosionada con nuevo tejido (osteoide; fase de formación), que más tarde mineralizará. Cuando este proceso ha finalizado el hueso entra en fase de reposo (Figura 5).

La vida media de la fase de resorción es de 1-3 semanas mientras que la de la fase de formación es de 1-3 meses. Debido a esta diferencia temporal, la eficiencia de los procesos debe ser similar, de manera que la cantidad de hueso formado y destruido sea compensado, a fin de mantener el nivel de masa ósea. El control de este proceso debe ser, como es lógico, extremadamente fino y exhaustivo, por lo que se establece una regulación a varios niveles (ver epígrafe 1.2).



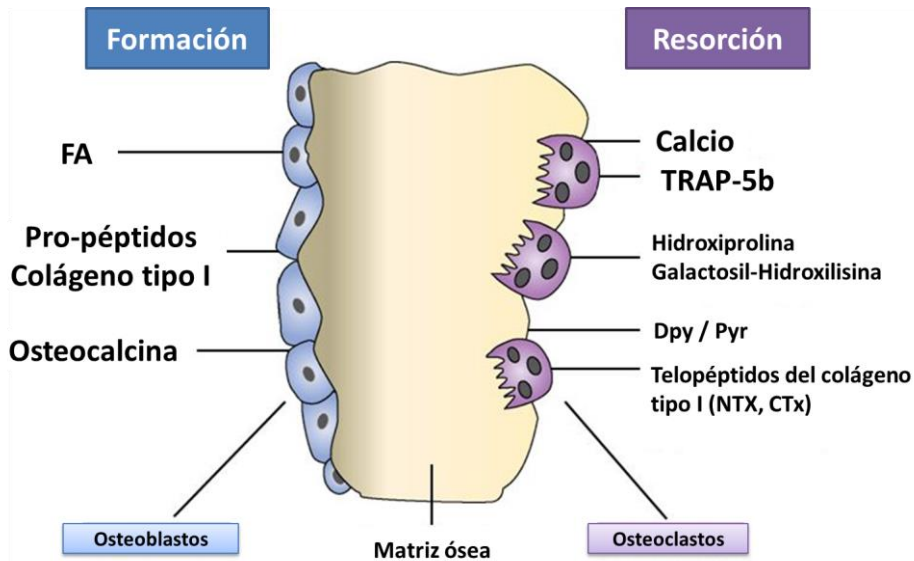


**Figura 5.** Fases del ciclo de remodelado óseo.

### 1.1.2.2 Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

La acción de las células óseas en el remodelado genera una serie de productos bioquímicos y metabolitos que se incorporan al torrente sanguíneo y nos proporcionan información para evaluar la tasa de formación o resorción, proporcionando detalles sobre el proceso de remodelado óseo.

Estos marcadores del remodelado pueden dividirse en marcadores de formación o de resorción, aunque algunos marcadores pueden reflejar ambos procesos (Hlaing and Compston 2014) (Figura 6).



**Figura 6.** Principales marcadores bioquímicos de remodelado óseo. [Modificado de (Fohr *et al.* 2003)].

#### ✓ Marcadores de formación ósea

Los marcadores de formación ósea son producidos por los OBs o derivados del metabolismo del procolágeno tipo I.

De entre los marcadores de formación ósea destaca la FA total, un enzima que se localiza en la parte exterior de la membrana celular de los OBs. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad total representa la suma de su actividad en hueso e hígado, y de manera más discreta, en el intestino. La FA se ve alterada por factores como la edad, el sexo y el estado hormonal.

A pesar de que la FA resulta un buen parámetro para evaluar el recambio óseo, puede alterarse si la isoenzima hepática se encuentra incrementada debido a un proceso patológico (Weaver *et al.* 1997; Minisola *et al.* 1998). Dado que existe una alta correlación entre la FA total y la FA ósea (Takahashi and Kushida 1997), evaluar la isoenzima ósea de la FA se ha revelado como un buen marcador de formación (Naylor and Eastell 2012).

La osteocalcina es una proteína específica del OB, que presenta gran afinidad por el calcio, siendo la proteína no colágena más abundante en el hueso. Al ser sintetizada, una parte se incorpora a la matriz, pero otra se vierte

a la circulación, lo que convierte a la osteocalcina en otro marcador importante, ya que es un metabolito que aumenta su nivel con la mineralización y diferenciación osteoblástica y se correlaciona con la formación de hueso. La osteocalcina sérica está aumentada en los niños, lo cual refleja la velocidad de crecimiento (Charles *et al.* 1985).

Los OBs producen la molécula de procolágeno que al ser procesada, sufre una escisión de sus extremos amino y carboxi-terminal (PINP y PICP, respectivamente) resultando como producto final la propia molécula de colágeno. Los extremos escindidos pasan al torrente sanguíneo y pueden ser determinados como marcadores de actividad osteoblástica (Naylor and Eastell 2012).

#### ✓ **Marcadores de resorción ósea**

Los marcadores de resorción ósea son, o bien los productos de degradación que se generan tras la actuación de los osteoclastos, o bien, los productos de degradación del colágeno.

La fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) es un enzima lisosomal que tiene dos formas circulantes, de ellas TRAP5b es secretada únicamente por el osteoclasto. Se ha descrito que existe una correlación negativa entre los niveles séricos de TRAP5b y la densidad mineral ósea (Halleen *et al.* 1999).

Respecto a los productos del de la degradación del colágeno tipo I, tras la rotura de la molécula hay una serie de metabolitos que pasan a la circulación. Algunos son aminoácidos modificados libres tales como la hidroxiprolina, la galactosil-hidroxilisina, la deoxipiridinolina (Dpy) y la piridinolina (Pyr), o unidos a péptidos, ya sea al segmento amino-terminal del colágeno (N-telopéptido, NTx) o carboxi-terminal (C-telopéptido, CTx) (Bonde *et al.* 1994).

## **1.2 Principales rutas y vías de señalización en la homeostasis ósea**

### **1.2.1 Regulación sistémica**

La regulación sistémica del remodelado óseo está controlada por una serie de hormonas, entre las que destacan las hormonas sexuales, la leptina, o las hormonas calciotropas (como la paratohormona (PTH) o el calcitriol (1,25-dihidroxitamina D3)).

La PTH es el regulador más importante en la homeostasis del calcio. Al disminuir los depósitos de calcio del organismo, ésta es secretada por la glándula paratiroidea. En el hueso, la PTH se encarga de estimular a los osteoblastos, que expresan RANKL y otras citoquinas, lo que promueve la diferenciación osteoclástica y, por ende, activa la resorción (Grey *et al.* 1999; Lee and Lorenzo, J 1999; Morony *et al.* 1999; Manolagas 2000; Henriksen *et al.* 2009). Así pues, la administración de PTH de forma continuada induce la resorción ósea de acuerdo con lo que se acaba de describir.

Sin embargo, este comportamiento cambia si la administración de PTH es intermitente. En este caso la hormona presenta una función anabólica, promoviendo la formación de hueso mediante la síntesis de IGF-I y TGF $\beta$  y una disminución de la apoptosis de OBs, lo que sugiere un comportamiento dual complejo de la PTH y refuerza su papel clave en la regulación del remodelado óseo (Rubin *et al.* 2002).

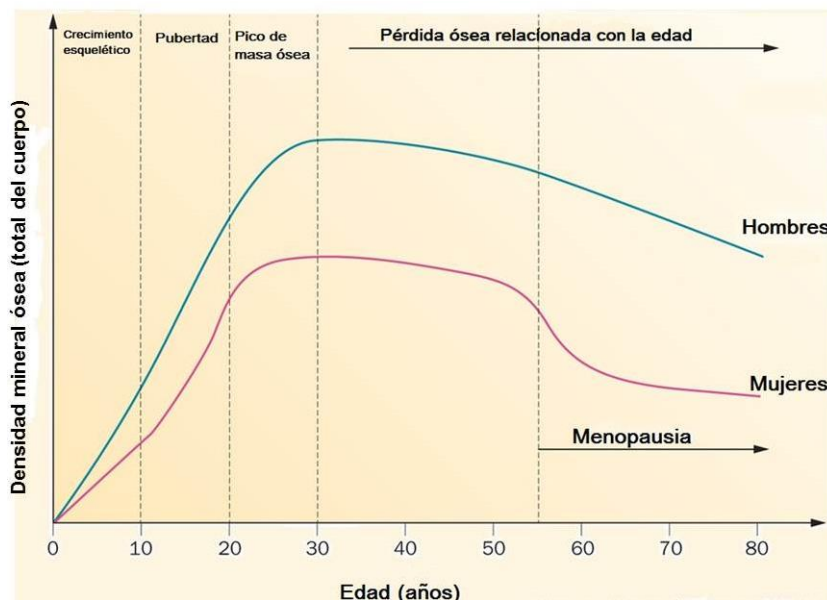
Por su parte, el calcitriol (1,25-dihidroxitamina D3) es la forma activa de la vitamina D. Esta molécula es la encargada de regular la reabsorción de calcio a nivel renal e intestinal. En el hueso, se encarga de promover la diferenciación de OBs y la maduración de OCs, por lo que promueve la resorción ósea, todo en colaboración con la PTH (Manolagas 2000).

Por último, la leptina es una hormona sintetizada por los adipocitos, que además de controlar el peso corporal y la reproducción, actúa como un potente inhibidor de la formación ósea (Gordon *et al.* 2004).

#### **1.2.1.1 Ruta endocrina del estrógeno**

La Densidad Mineral Ósea (DMO) va variando a lo largo de la vida (Figura 7). Durante la etapa de crecimiento la formación de hueso supera a la resorción, hacia los 30 años de edad se alcanza el pico de masa ósea y a partir

de este momento se produce una meseta durante algunos años en la que existe un equilibrio entre formación y resorción ósea. Tras este periodo, la tendencia se ve invertida, predominando la resorción, lo que hace que la masa ósea vaya disminuyendo con la edad.



**Figura 7.** Evolución de la masa ósea en relación a la edad. [Modificada de (Hendrickx et al. 2015)].

La DMO total es siempre inferior en el caso de las mujeres, pero al finalizar la meseta, la pérdida es mucho más acusada en las mujeres debido a la deprivación estrogénica que ocurre en la menopausia. Este cambio hormonal provoca un desequilibrio e induce una activación del remodelado óseo, favoreciendo la resorción frente a la formación de hueso, lo que deriva en una mayor pérdida de masa ósea en esta etapa de la vida de la mujer. A este tipo de osteoporosis se la conoce como osteoporosis tipo I (Riggs *et al.* 1998), y principalmente cursa con fracturas vertebrales.

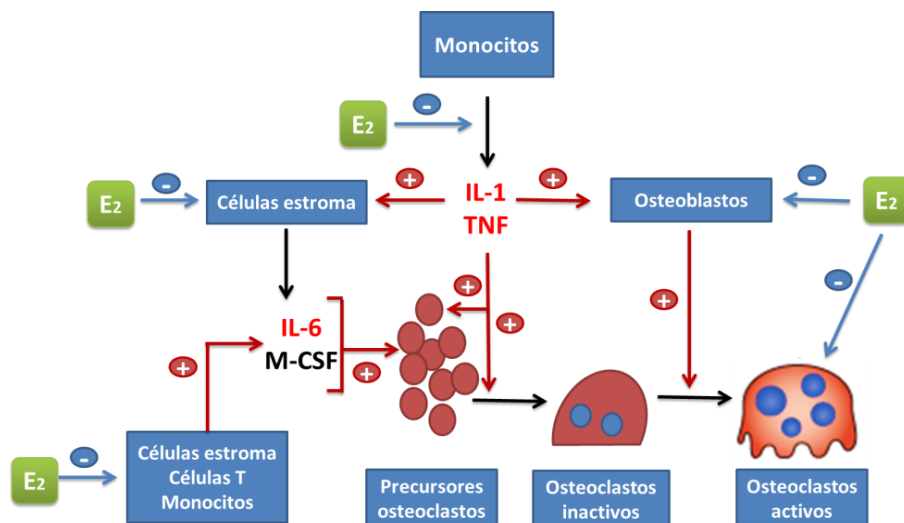
Los estrógenos son una pieza fundamental de la regulación de la homeostasis ósea, y su deficiencia está estrechamente asociada a la pérdida ósea y al desarrollo de osteoporosis postmenopáusica, y es que, tanto los OBs como los OCs, poseen receptores estrogénicos, por lo que son susceptibles a su acción (Khosla *et al.* 2012).

Se ha descrito que los estrógenos disminuyen la respuesta de los progenitores osteoclásticos a RANKL, impidiendo su diferenciación, y por tanto la resorción ósea y además contribuyen a la proliferación de los OBs y disminuyen su apoptosis (Hadjidakis and Androulakis 2006).

Los estrógenos, además, regulan gran cantidad de citoquinas en el microambiente óseo, entre las que destacan IL-1, IL-6 y TNF (Figura 8). IL-1 y TNF son dos citoquinas con un elevado poder resortivo a nivel local y, además, actúan como inhibidores de la formación ósea (Pacifci 1996). Está demostrado que existe una producción aumentada de IL-1 y TNF en mujeres osteoporóticas u ovariectomizadas y que estos niveles disminuyen si se administra estrógenos a las pacientes (Pacifci *et al.* 1987; Manolagas 2000). Estas dos citoquinas estimulan la proliferación de precursores osteoclastogénicos, y a su vez, inducen la expresión de otras citoquinas reguladoras de este proceso como RANKL, IL6 y MCSF (Hofbauer *et al.* 1999).

La IL-6, por su parte, es sintetizada por las células madre mesenquimales y OBs en respuesta a la deficiencia estrogénica, y actúa como un potente agente osteoclastogénico (Pacifi 1998).

Estas tres citoquinas inducen resorción ósea y diversos estudios han demostrado que su expresión disminuye con la administración de estrógenos (Pacifci 1996; Manolagas 2000).



**Figura 8.** Representación esquemática de los efectos de las citoquinas y el estrógeno en la diferenciación y activación osteoclástica. En rojo se muestran los estímulos inductores y en azul los represores. [Modificada de (Pacifi 1996)].

### 1.2.2 Regulación en el microambiente óseo

Hay vías de señalización estrechamente relacionadas a la regulación del microambiente óseo a nivel local. Las principales vías son el sistema RANK/RANKL/OPG y la vía Wnt/ $\beta$ catenina. Además, la regulación a este nivel está sujeta a numerosos factores, como citoquinas y factores de crecimiento que actúan sobre las células óseas, regulando sus funciones (Tabla 1).

La principal consecuencia de un aumento en los niveles de citoquinas promotoras de la resorción (por ejemplo IL-1, IL-3 o IL-6) es un incremento en el número de OCs y una mayor tasa de osteoclastogénesis, aumentando su actividad y su tiempo de vida medio (Pacifi 1998). Además, el incremento en los niveles de estas citoquinas también se acompaña de una inducción de una mayor actividad osteoblástica con el objetivo de intentar compensar la pérdida ósea que se está produciendo. Además del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), que está implicado en la diferenciación de los pre-osteoclastos, y el factor estimulador de colonias de

macrófagos (M-CSF), que es un factor clave para la diferenciación del OC. (Grey *et al.* 1999; Katagiri and Takahashi 2002).

**Tabla 1.** Factores reguladores del metabolismo óseo a nivel local.

<b>Estimulador</b>	<b>Factor</b>	<b>Función</b>
<b>Formación</b>	<b>IGF-1</b>	Estimula la formación de precursores OBs y la síntesis de matriz
	<b>IL-4</b>	Inhibe maduración OCs
	<b>IL-10</b>	Inhibe maduración OCs
	<b>IL-13</b>	Inhibe maduración OCs
	<b>IL-12</b>	Inhibe la osteoclastogénesis
	<b>IL-18</b>	Inhibe la osteoclastogénesis
	<b>TGFβ</b>	Inhibe apoptosis de OBs, e induce la de OCs. Estimula síntesis de OPG
	<b>INFγ</b>	Inhibe formación de OCs y estimula la producción de ILs anti-osteoclastogénicas.
	<b>Óxido nítrico</b>	Inhibidor OCs.
<b>Resorción</b>	<b>IL-1</b>	Activador OCs maduros
	<b>IL-3</b>	Estimula diferenciación de precursores de OCs
	<b>IL-6</b>	Estimula la formación de OCs, vía precursores hematopoyéticos.
	<b>IL-11</b>	Estimula la producción de RANKL por OBs
	<b>M-CSF</b>	Estimula maduración de OCs
	<b>TNFα</b>	Estimula la diferenciación de OCs
<b>Dual</b>	<b>BMP</b>	Estimulan la diferenciación de OBs y pueden estimular la resorción. Inducen la diferenciación de células del tejido conectivo a células osteoprogenitoras.

Entre los factores promotores de la formación, además de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 e INFγ, que inhiben la osteoclastogénesis, hay que destacar a las BMPs, que como ya se ha visto, regulan la diferenciación osteoblástica mediante la inducción de la expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación del OB, y el TGF-β, que se trata de un factor implicado en la inhibición de la apoptosis osteoblástica y, además, estimula la apoptosis de los OCs por lo que favorece la formación ósea (Reyes García *et al.* 2008).



### 1.2.2.1 Sistema RANK/RANKL/OPG

La aparición constante estas moléculas en epígrafes anteriores denota la importancia de este sistema en la regulación del remodelado óseo.

La proteína RANKL (*receptor activator of nuclear factor KB ligand*) se expresa en la membrana de OBs y células madre mesenquimales en respuesta a inductores de la resorción ósea. La expresión de RANKL por los OBs coordina el remodelado óseo ya que inhibe la apoptosis de los OCs y estimula su diferenciación y activación induciendo así la resorción ósea. El receptor de membrana de esta proteína, RANK (*receptor activator of nuclear factor KB*), se expresa en los pre-OCs y en OCs maduros.

Así, la unión de RANKL a su receptor, junto con M-CSF es una señal necesaria y suficiente para inducir la diferenciación y la activación de OCs (Manolagas 2000) (Figura 9). En pre-OCs esta unión favorece la diferenciación a OCs maduros, y en éstos, la unión induce la activación y prolonga la supervivencia. Se ha descrito que ratones deficientes en RANKL o su receptor, RANK, tienen mucha mayor masa ósea u osteopetrosis (Kong *et al.* 1999).

Más recientemente, se ha descrito que los osteocitos podrían tener un papel fundamental regulando el remodelado óseo en adultos por esta vía (Nakashima *et al.* 2011) ya que, en su apoptosis, los osteocitos liberan cuerpos apoptóticos que expresan RANKL para reclutar OCs (Bonewald 2011).

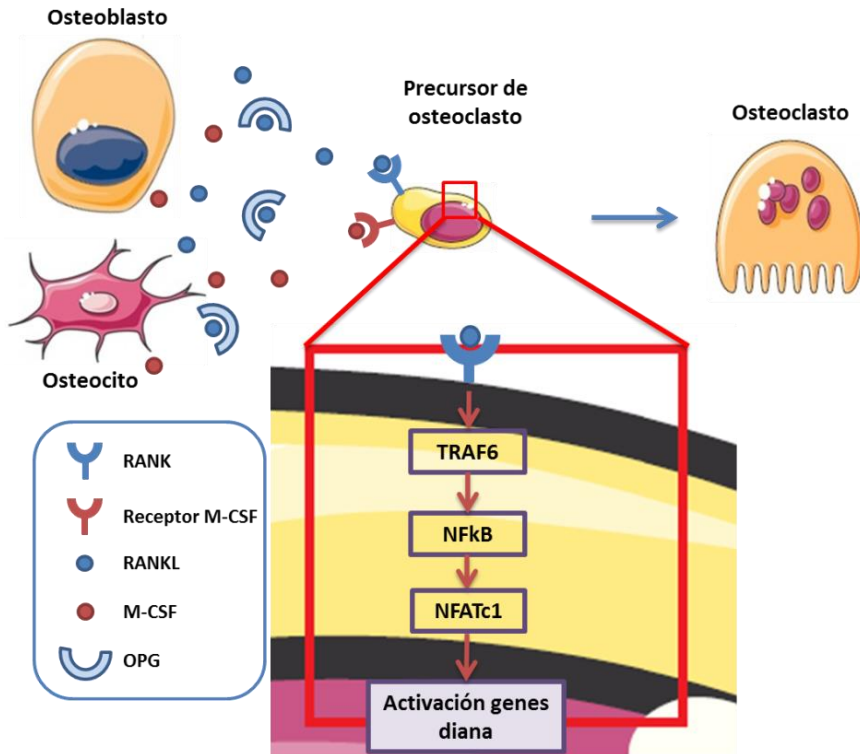
La osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble que, en el hueso, es producida por los OBs y células de madre mesenquimales en respuesta a factores anti-resortivos (TGF $\beta$ , BMP, etc.), aunque se ha descrito que la mayor fuente de síntesis de OPG en la medula ósea son las células B (Li *et al.* 2007a). La OPG es un receptor señuelo para RANKL, es decir, es capaz de unirse a RANKL y bloquear su unión a RANK (Simonet *et al.* 1997). El balance entre RANKL y OPG es clave a la hora de explicar si en un sistema predomina la osteoclastogénesis o la formación ósea (Figura 9).

La deficiencia de OPG en modelos murinos, al contrario de lo descrito para RANK y RANKL, se presenta con una marcada pérdida ósea debido a una alta tasa de osteoclastogénesis, con numerosas fracturas de huesos largos y además calcificación arterial (Bucay *et al.* 1998).

Respecto a la regulación genética, tal como se muestra resumidamente en la Figura 9, cuando RANKL se une a su receptor RANK se activan varias vías de señalización intracelular que inducen la expresión de genes relacionados con la osteoclastogénesis. Tras la unión RANK-RANKL, la parte citoplasmática de RANK interacciona con las proteínas adaptadoras TRAFs (factores asociados al receptor de necrosis tumoral) (Armstrong *et al.* 2002). Las TRAFs inician la cascada de señalización a través de varias vías (NFkB, JNK, Src, etc.), siendo la vía NFkB quizás la más importante. NFkB se trasloca al núcleo y junto al complejo AP1, activado gracias a la estimulación de la vía JNK, inducen la expresión del factor de transcripción NFATc1, que debe trasladarse al núcleo para ejercer su función, vía activación de la calcineurina. Una vez en el núcleo NFATc1 induce la expresión de varios genes implicados en la maduración y actividad osteoclastica, como la TRAP, la catepsina K, el receptor de calcitonina y la integrina  $\beta 3$  (Kearns *et al.* 2008).

La regulación de la expresión de RANKL y/o OPG en las células óseas está modulada por numerosos factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y fármacos. La regulación de la expresión de RANK, sin embargo, se ve mínimamente afectada por estos factores y se restringe fundamentalmente a las células inmunes (Theoleyre *et al.* 2004).

Muchas moléculas modulan el sistema RANKL-OPG activando la expresión de RANKL y disminuyendo, en casi todos los casos, la expresión de OPG. En general, casi todas las moléculas que ejercen una función sobre el hueso lo hacen a través de interacciones con el OB ya que el OC carece de los receptores apropiados. Así, la mayoría de las hormonas calciotropas y citoquinas resortivas (calcitriol, PTH, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) activan la expresión de RANKL en los OBs y disminuyen la expresión de OPG, favoreciendo por tanto la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Sin embargo, esta situación puede ser revertida por la OPG cuya expresión se ve favorecida por la acción de citoquinas antiresortivas (INF $\gamma$ , IL-4, etc.) y actúa inhibiendo la osteoclastogénesis inducida por RANKL (Kearns *et al.* 2008). Por tanto, la ratio OPG/RANKL es un factor determinante en el metabolismo óseo al inclinar la balanza hacia formación o resorción ósea.



**Figura 9.** Vía de señalización RANK/RANKL/OPG. Tras la activación de M-CSF, se produce la unión de RANKL a su receptor de membrana, lo que desencadena la activación de genes de diferenciación del OC. La OPG bloquea esta unión mediante la interacción con RANKL, inhibiendo la diferenciación de los OCs.

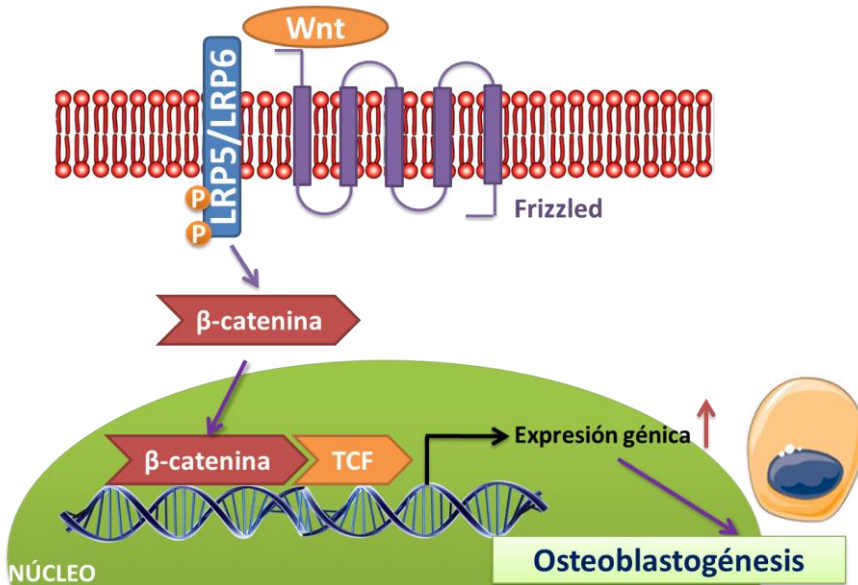
### 1.2.3 Vía Wnt/ $\beta$ catenina

La vía de señalización Wnt es esencial en procesos como la embriogénesis o la regeneración de tejidos (Westendorf *et al.* 2004), pero su regulación abarca otros muchos procesos, como es el caso de la homeostasis ósea, ya que se encarga de regular la osteoblastogénesis y la formación de hueso (Kubota *et al.* 2009).

La transducción de señal intracelular de la vía Wnt es compleja e incluye varias rutas. Quizá la más conocida sea la denominada ruta canónica, que comienza con la unión de los ligandos de Wnt a receptores de membrana compuestos por una proteína Frizzled y un co-receptor LRP (*lipoprotein*

*receptor-related protein*). Se han descrito, al menos, diez miembros de la familia Frizzled, y numerosas proteínas LRP, con efectos antagónicos sobre la señalización de Wnt, si bien LRP5 y LRP6 son los miembros más conocidos de esta familia.

Brevemente, cuando las proteínas Wnt se unen a Frizzled y LRP5/LRP6, la  $\beta$ -catenina es estabilizada y se libera de las proteínas con las que está normalmente unida en el citoplasma, trasladándose al núcleo, donde se acumula y activa a miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF (LEF, *lymphoid enhancer factor*; TCF *T-cell factor*), lo que hace que éstos pasen de represores a activadores de la transcripción, lo cual conduce a un aumento en la diferenciación celular de OBs y células madre hematopoyéticas (Figura 10) (Luis *et al.* 2009).



**Figura 10.** Esquema de la ruta de señalización Wnt. [Modificada de (Kahn 2014)].

Dada la importancia de la señalización mediante esta vía, las mutaciones para receptores de Wnt se asocian a cambios importantes en la DMO y en el riesgo de fractura.

Como se ha visto, el papel de la proteína LRP5 es clave en la homeostasis ósea, ya que actúa como inductor de la diferenciación de OBs y se encarga de la inhibición de la apoptosis de OBs y osteocitos incrementando

los niveles de  $\beta$ -catenina. Las mutaciones de ganancia de función en el gen *LRP5* causan un tipo de osteopetrosis autosómica dominante (Johnson *et al.* 1997a), mientras que mutaciones de pérdida de función causa el síndrome de osteoporosis pseudoglioma caracterizado por una masa ósea baja y ceguera (Gong *et al.* 1996).

Además, se han descrito factores que inhiben la señalización de esta vía, como Dkk-1 (Dickkopf-1) que se unen directamente a LRP5, impidiendo la unión de Wnt, o la esclerostina, proteína secretada por los osteocitos, que bloquea la acción de Wnt a nivel de la membrana, lo que resulta en la inhibición de la osteoblastogénesis (Yavropoulou and Yovos 2007).

### **1.3 Regulación del metabolismo óseo por el sistema inmune: Osteoinmunología**

La regulación de la homeostasis ósea está influenciada por tres sistemas: el óseo, el hematopoyético y el inmune, y la interacción de estos tres sistemas ha dado lugar a la aparición de una nueva disciplina de estudio que se ha denominado Osteoinmunología (Arron and Choi 2000).

Cada vez más evidencias apoyan la hipótesis de la importancia de la interrelación entre estos sistemas, y aunque la procedencia de las células que los componen es diferente, existen influencias claras entre ellas debido a que se encuentran compartiendo nicho en la médula ósea. Así, las células formadoras de hueso (OBs), las células resortivas (OCs) y las células inmunes (principalmente linfocitos T y B, células dendríticas y monocitos), junto a sus precursores respectivos, comparten muchas citoquinas reguladoras, receptores, moléculas señalizadoras y factores de transcripción (Lorenzo *et al.* 2008; Ralston and Uitterlinden 2010).

El hueso juega un papel en la respuesta inmunitaria adaptativa que va más allá del desarrollo linfocitario. Entre otras muchas evidencias, los linfocitos T y B de memoria regresan a sus nichos especializados en la médula ósea (Walsh *et al.* 2006), y las células óseas expresan moléculas de superficie que son esenciales para la expansión de las células madre hematopoyéticas de

las cuales derivan todas las células de la sangre y del sistema inmune (Pacifci 2010).

El sistema inmunitario, por su parte, se encarga de regular en gran parte la homeostasis ósea vía el sistema RANK/RANKL/OPG tal como se ha descrito previamente (ver epígrafe 0). Si bien este sistema es fundamental, hay otras muchas evidencias de esta relación, como que células inmunes como los linfocitos T y B, así como algunas citoquinas (INF $\gamma$  o TNF) y otros factores, están implicados en la regulación del desarrollo y homeostasis de las células óseas (Pacifci 2010). De hecho, la pérdida de hueso es una constante en enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Los OBs están estrechamente vinculados a las células del sistema hematopoyético, aunque no comparten linaje, mientras que los OCs tienen un origen mieloide que comparten con macrófagos y células dendríticas (Walsh *et al.* 2006). Además, las células madre mesenquimales de la médula ósea pueden diferenciarse a OBs u osteocitos. Finalmente, las células hematopoyéticas producen citoquinas y factores de crecimiento esenciales para el desarrollo de las células del hueso (Pacifci 2010), y, como ya se ha visto en el apartado 1.1.2.1, las citoquinas producidas por el sistema inmune regulan procesos como el remodelado óseo.

### **1.3.1 Función del sistema CD40/CD40L en la regulación del metabolismo óseo**

El par de moléculas CD40/CD40L tiene una función muy relevante tanto en el sistema inmune como en el esquelético. CD40L (también conocido como CD154) se expresa transitoriamente en las células T activadas y su receptor, CD40, es expresado por las células presentadoras de antígeno, células progenitoras hematopoyéticas y células del linaje osteoblástico (Ahuja *et al.* 2003; Elgueta *et al.* 2009).

Este sistema es fundamental en la diferenciación y activación de macrófagos, cambio isotípico de anticuerpos y la adquisición de memoria inmunológica por parte de las células B. Tanto es así, que se ha demostrado que ratones *knockout* para estas moléculas presentan una menor producción de

OPG y manifiestan signos de osteoporosis (Li *et al.* 2007a). Además, estudios previos del grupo han mostrado asociación de polimorfismos en el gen *CD40* con DMO (Pineda *et al.* 2008).

### **1.3.2 Papel de la célula T en la homeostasis ósea**

Las células T, fundamentalmente aquellas que se localizan en la médula ósea, tienen un papel importante en la regulación del hueso, mediando a través de varios mecanismos tanto en la formación como en la resorción ósea.

Estas células secretan citoquinas osteoclastogénicas como RANKL y TNF $\alpha$ , lo que provoca la pérdida de hueso en enfermedades inflamatorias, así como ligandos de la vía Wnt que activan la formación de hueso por parte de los OBs. Seguramente, estas funciones dependen del grado de diferenciación de las células T en cada caso (Pacifci 2017).

Se ha descrito que las células T median en la respuesta a PTH, de hecho, las ratonas deficientes en células T no pierden masa ósea con la administración continua de PTH, lo cual apoya el papel regulador de la célula T en la respuesta osteoclastogénica a PTH. Esta regulación está mediada por el sistema CD40/CD40L (Gao *et al.* 2008).

Además, se ha publicado que la ovariectomía provoca una pérdida de masa ósea que no afecta a las ratonas deficientes en células T (Cenci *et al.* 2000) ni a ratonas deficientes en CD40L (Li *et al.* 2011). Sin embargo, esto ha sido puesto en duda por el grupo de Lee y cols., que comprobaron que la pérdida de hueso trabecular en diferentes modelos murinos de deficiencia de célula T era similar al modelo WT (Lee *et al.* 2006).

Asimismo, la ovariectomía induce una activación de la célula T en la médula ósea promoviendo un incremento en la presentación antigénica. Además, los estrógenos regulan la producción de TNF por parte de las células T reprimiendo la producción de IL-7, un potente inductor de la destrucción de hueso (Pacifci 2012a), lo que sugiere el rol central de la célula T en la pérdida ósea por deficiencia estrogénica.

### **1.3.3 Papel de la célula B en la homeostasis ósea**

El papel de la célula B como regulador del metabolismo óseo ha trascendido al de productor únicamente de citoquinas reguladoras, demostrándose su implicación en muchos más niveles.

La implicación de la célula B en la etiología de la osteoporosis postmenopáusica fue descrita por Miyaura y cols. en 1997. En este trabajo se describió que la deficiencia estrogénica aumenta la producción de células B vía estimulación de IL7. Asimismo, la producción de citoquinas por parte de los linfocitos B contribuye a la pérdida ósea inducida por la ovariectomía.

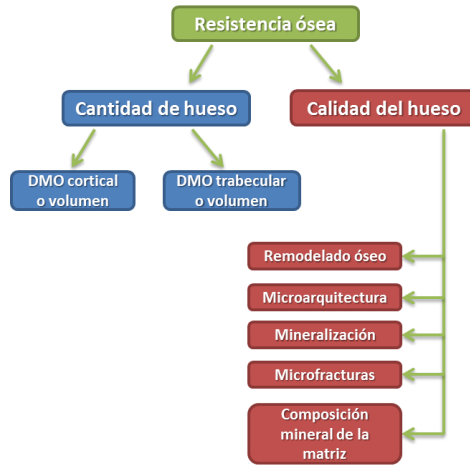
Muchas células diferentes pueden producir RANKL, por lo que potencialmente todas ellas podrían regular el aumento de la osteoclastogénesis inducida por la privación de estrógenos. No obstante, se ha comprobado que ratones que carecen de RANKL en las células B, pero no en las células T, muestran una protección considerable contra la pérdida ósea, por lo que se ha sugerido que la producción de citoquinas por parte de las células B pueda estar implicada en la pérdida ósea tras ovariectomía (Onal *et al.* 2012).

De la misma manera que ocurría para los ratones deficientes en CD40/CD40L, los ratones deficientes en células B muestran peor microarquitectura ósea y niveles más bajos de DMO que ratones normales. Esta deficiencia se asocia a una elevada tasa de resorción y menor síntesis de OPG. Ya hace una década que se describió a la célula B como principal fuente de OPG en la médula ósea (Li *et al.* 2007a), si bien no se han aportado nuevas evidencias en este sentido desde entonces.

## **1.4 Caracterización del estado óseo. Fenotipos estudiados**

La caracterización del estado óseo se basa en el estudio de la resistencia del mismo, para lo que tradicionalmente la DMO ha sido el parámetro que ha determinado la definición del estado óseo. No obstante, la resistencia ósea no está limitada únicamente a la densidad que presente el hueso, sino que existen otras variables que influyen en el estado óseo, como la microarquitectura, la tasa de recambio o la mineralización, parámetros que determinan la calidad y por tanto la resistencia ósea (Figura 11).





**Figura 11.** Factores determinantes de la resistencia ósea [modificado de (Moorthi and Moe 2013)].

### ✓ **Densidad mineral ósea (DMO)**

La DMO está considerada el *gold standard* en el diagnóstico de osteoporosis y la predicción del riesgo de fractura en la práctica clínica, ya que una baja masa ósea supone un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de fracturas óseas por fragilidad (Cauley *et al.* 2005). Esta determinación también se usa para monitorizar la tasa de ganancia en masa ósea cuando se instaura un tratamiento determinado.

La determinación de la DMO se realiza fundamentalmente mediante una técnica denominada absorciometría dual de rayos X (DXA), una técnica no invasiva que se basa en la obtención de una imagen a partir de la ralentización que sufren los rayos X al atravesar el tejido óseo. Dado que la mayor parte de fracturas osteoporóticas se concentran en la columna lumbar y el cuello de fémur proximal, es en estas dos localizaciones donde se determina la DMO de forma general. La medición en la columna se suele realizar entre las vértebras L2 a L4, mientras que en el fémur se suelen realizar mediciones en el cuello femoral, en el trocánter y en el triángulo de Ward.

La Organización Mundial de la Salud recomienda una clasificación clínica de la osteoporosis basada en las determinaciones de DMO en cadera,

columna y antebrazo tras expresarla como desviaciones estándar (DE). Uno de los parámetros analizados es el Valor T (*T-score*) y se calcula como la diferencia de DMO medida entre los pacientes y adultos jóvenes sanos de su misma raza y sexo. Se considera que las pacientes con un valor  $T \geq -1$  presentan un estado óseo normal;  $-2.5 < T < -1$  se considera un estado de osteopenia y un valor  $T \leq -2.5$  es el nivel que se considera como osteoporosis (Blake and Fogelman 2009).

$$\text{Valor } T = \frac{\text{DMO medida} - \text{DMO media adultos jóvenes}}{\text{DE adultos jóvenes}}$$

Dado que la DMO es un parámetro claramente ligado a la edad, es importante tenerla en cuenta en las determinaciones, por eso otra de las variables usualmente utilizadas es el Valor Z (*Z-score*), que compara los valores de DMO de los pacientes con aquellos de la población de su misma edad y sexo.

$$\text{Valor } Z = \frac{\text{DMO medida} - \text{DMO media población misma edad}}{\text{DE población misma edad}}$$

La limitación que presenta la DMO como parámetro es que no es un indicador instantáneo del recambio óseo, sino que refleja cambios ocurridos a lo largo del tiempo, de ahí la importancia de combinar su determinación con la de marcadores bioquímicos tradicionales y nuevos biomarcadores que pueden informarnos sobre el estado óseo en el momento presente.

#### ✓ **Calidad ósea**

La calidad ósea, como se ha comentado previamente, engloba una serie de factores, tales como el remodelado, el cúmulo de lesiones (microfracturas), la mineralización y la geometría óseas. Pero, así como la DMO es cuantificable y nos permite establecer valores de normalidad, esto no ocurre con tanta facilidad en el caso de la calidad ósea, si bien hay aproximaciones que tratan de informar de ella.

El remodelado óseo es un proceso fundamental en la determinación de la calidad ósea debido a que está estrechamente ligado a la arquitectura, mineralización y la geometría del hueso. (Mellibovsky-Saidler and Díez-Pérez 2006). La influencia del remodelado óseo en la calidad del hueso se basa en que interviene directamente en la correcta formación del mismo, de ahí que las alteraciones en el remodelado sean la causa de gran parte de osteopatías.

La resistencia a las fracturas está influenciada en gran parte por el grado de mineralización. Los cristales de hidroxiapatita y fosfato proporcionan al hueso su rigidez y resistencia. La calidad de la mineralización viene determinada por la cantidad, grado de compactación y ordenación de los microcristales entorno a las fibras de colágeno. Dentro de los límites de la normalidad, el grado de mineralización se correlaciona con la dureza del tejido óseo y es inversamente proporcional a su fragilidad. Cuando existe un exceso de mineralización el hueso se vuelve más rígido y aumenta el riesgo de fractura (Mellibovsky-Saidler and Díez-Pérez 2006).

Otro factor determinante de la calidad ósea es la composición de la matriz, tanto colágena como no colágena. La expresión de las variantes del gen del colágeno determina en buena medida esta composición (Mellibovsky-Saidler and Díez-Pérez 2006).

Así pues, el comportamiento dinámico del hueso viene determinado por tres niveles estructurales: macroestructura (geometría ósea), microestructura (disposición tridimensional de la trama ósea) y ultraestructura (composición y arquitectura a escala molecular) (Mellibovsky-Saidler and Díez-Pérez 2006).

La determinación de la calidad ósea se basa en una serie de herramientas que nos aproximan parcialmente al conocimiento del estado real del hueso. Para evaluar el remodelado se dispone de la histomorfometría ósea mediante biopsia y la tomografía por emisión de positrones. La microarquitectura del hueso puede valorarse mediante la histomorfometría ósea, la resonancia magnética (RM) y la microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) *in vivo* e *in vitro*, entre otros (Mellibovsky-Saidler and Díez-Pérez 2006).

### **1.4.1 Osteoporosis**

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica comúnmente asociada a la edad, que se caracteriza por una baja masa ósea y un deterioro en la microarquitectura del hueso, lo que está relacionado con un aumento de fracturas óseas por fragilidad (Kanis *et al.* 2013). Consecuentemente, la osteoporosis se relaciona con un nivel de mortalidad y morbilidad elevado, en especial en países desarrollados (Kanis *et al.* 2008a). Ésta es una patología multifactorial compleja que resulta de complejas interacciones entre factores de susceptibilidad genética y factores ambientales (Ralston and Uitterlinden 2010; Kanis *et al.* 2013).

#### ✓ **Epidemiología**

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y aunque afecta a ambos sexos, el riesgo de aparición es más elevado en mujeres. La prevalencia de la enfermedad en Europa en pacientes mayores de 50 años se estima en un 22% de las mujeres y en un 6.5% de los varones, aumentando hasta el 47.2% en mujeres mayores de 80 años (Hernlund *et al.* 2013). Por tanto, según estos datos, es lógico encontrar un mayor índice de fracturas osteoporóticas en mujeres que en varones.

#### ✓ **Etiopatogenia de la enfermedad**

Aunque la etiopatogenia de la osteoporosis es aún desconocida, existen una serie de factores de riesgo que están asociados a la aparición de la misma.

Los factores de riesgo se pueden clasificar como modificables o no modificables. Entre los modificables se encuentran escasa actividad física, escasa ingesta de calcio, dieta hiperproteica, un consumo excesivo de alcohol o café, el tabaquismo y el uso de corticoides, inmunosupresores y anticoagulantes. Los no modificables incluyen la raza blanca, la edad, el sexo, la menopausia, el hipogonadismo, enfermedades endocrinas, reumatológicas, nutricionales o neoplasias, y los factores genéticos de predisposición.

La importancia de los factores genéticos en la osteoporosis está fuera de toda duda. Ciertamente, hay abundantes evidencias obtenidas en estudios en gemelos, familiares y epidemiológicos que revelan una contribución genética

significativa a la variación fenotípica de la DMO. Efectivamente, se han descrito heredabilidades entre el 0.5 y 0.8 para fenotipos óseos como la DMO, la geometría ósea, el recambio óseo o las propiedades de ultrasonidos del hueso, y por supuesto, aunque algo menores para la fractura ósea (Ralston *et al.* 2006; Peacock *et al.* 2010; Ralston and Uitterlinden 2010).

La osteoporosis es de naturaleza poligénica, con múltiples rutas génicas implicadas en su regulación, con contribuciones discretas de cada variante génica al fenotipo final. De hecho, la combinación de todas las variantes genéticas identificadas hasta el momento solo explica un porcentaje muy pequeño de la varianza fenotípica total de la DMO o fractura ósea. Esto ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para explicar esta heredabilidad perdida, como en los mecanismos epigenéticos como mediadores en la interacción de los genes con el medio ambiente.

La osteoporosis puede clasificarse en primaria (involutiva) o secundaria. La osteoporosis involutiva es la más frecuente e incluye a su vez tres subgrupos: la osteoporosis idiopática juvenil, que afecta a niños o adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal normal; la osteoporosis postmenopáusica o tipo I, que se produce en la mujer como consecuencia de la deficiencia estrogénica y conlleva una pérdida ósea acelerada que afecta principalmente al hueso trabecular y la osteoporosis senil o tipo II, que se produce en ambos sexos como consecuencia de la pérdida de masa ósea que se produce por el proceso de envejecimiento. Se considera osteoporosis secundaria la derivada de alguna otra enfermedad o tratamiento (Hermoso de Mendoza 2003).

#### **1.4.1.1 Osteoporosis postmenopáusica**

Tal como se ha visto en el apartado 1.1.2, la masa ósea aumenta con la edad hasta alcanzar el pico máximo de masa ósea en torno a la treintena, momento en el que se alcanza un equilibrio entre la formación y la resorción ósea. A partir de este momento se empieza a perder masa ósea a nivel del hueso trabecular de una manera controlada. Este equilibrio se mantiene hasta la cincuentena, momento en que se produce una disminución de la masa ósea también a nivel del hueso cortical y de una manera más acusada.

En las mujeres esta disminución es todavía más evidente debido a la pérdida de estrógenos que se da durante la menopausia, ya que como se ha comentado en el apartado 1.2.1.1, la deprivación estrogénica tiene un papel fundamental al favorecer la resorción y fomentar la pérdida ósea. Esta pérdida es fundamentalmente de hueso trabecular, lo que acaba desencadenando el desarrollo de osteoporosis y favoreciendo la aparición de fractura ósea, principalmente vertebrales.

#### **1.4.2 Fractura por fragilidad**

La fragilidad se define como una condición clínica de vulnerabilidad que resulta de la degeneración relacionada con el envejecimiento (Li *et al.* 2017). La fractura ósea por fragilidad es considerada uno de los mayores problemas del sistema de salud, debido a su alta prevalencia en poblaciones envejecidas, su elevada morbi-mortalidad, su impacto físico y mental en los pacientes y su alto coste económico (Bliuc *et al.* 2009).

Se calcula que en torno al 45% de mujeres de la UE mayores de 50 años sufrirá una fractura en los próximos 10 años (Kanis *et al.* 2013) y de estas, la fractura de cadera es la más incapacitante y de peor pronóstico (Kanis *et al.* 2003).

La osteoporosis es el factor de riesgo más conocido para el desarrollo de una fractura ósea por fragilidad, pero no es el único. La edad, el bajo peso corporal, la baja actividad física, la sarcopenia o el déficit de vitamina D, son algunos de ellos.

Establecer, por tanto, un perfil de riesgo de sufrir una fractura por fragilidad es primordial, tanto para los pacientes potenciales como para la sostenibilidad de los sistemas de salud.

En la actualidad, los clínicos disponen de una herramienta web denominada FRAX (<http://www.shef.ac.uk/FRAX>), que calcula la probabilidad de sufrir de una fractura mayor en el plazo de 10 años valiéndose de una serie de parámetros antropométricos y de estilo de vida del paciente, pudiendo incluso tener en cuenta la DMO (Kanis *et al.* 2008b).

Las limitaciones del FRAX se basan en que esta herramienta no tiene en cuenta factores fundamentales como el número de fracturas previas, la

duración y dosis de tratamientos con glucocorticoides o la cantidad de tabaco o alcohol ingerido, entre otros factores (Hans *et al.* 2011). Además, el hecho de que haya gran parte de las fracturas con valores normales de DMO hace patente la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que ayuden a predecir con mayor rigor el riesgo de fractura por fragilidad.

### **1.5 Genética de la osteoporosis y de la fractura ósea**

Las enfermedades multifactoriales son aquellas cuya etiología responde a factores ambientales, genéticos y epigenéticos. A pesar de que la osteoporosis tiene un claro componente genético, su modelo de transmisión es complejo, ya que, aunque puede haber un gran número de variantes genéticas implicadas en la aparición de estas patologías, ninguna de ellas es en sí misma suficiente para el desarrollo de la enfermedad, sino que todas contribuyen en modo aditivo. Los factores genéticos pueden además interaccionar entre sí o con el ambiente. Todo ello dota a las enfermedades complejas en general, y a la osteoporosis en particular, de características que las definen, tales como gran heterogeneidad clínica, expresividad variable y penetrancia incompleta.

Para la identificación de los factores genéticos implicados en las enfermedades multifactoriales existen varios tipos de estudio. A fin de encontrar los genes reguladores subyacentes de susceptibilidad a baja masa ósea y osteoporosis se han usado varias estrategias, como estudios de gen candidato con hipótesis previa, estudios de asociación a lo largo del genoma (GWAS) sin hipótesis previas, y estudios funcionales (Ralston and Uitterlinden 2010).

La aproximación principal son los estudios de asociación genética, ya que constituyen la herramienta más potente para detectar variantes de susceptibilidad con un efecto débil. Estos estudios se basan en la búsqueda de desequilibrios de ligamiento, presentándose una variante genética con mayor frecuencia en un grupo afectado frente a uno de no afectados dentro de la misma población, o bien asociándose a mayores o menores niveles en una característica cuantitativa.

Dada la incapacidad de las variantes genéticas encontradas hasta la actualidad para explicar la variabilidad fenotípica que se presenta en estas patologías, en los últimos años se ha comenzado a explorar la implicación de la Epigenética en la homeostasis ósea. Entendemos como Epigenética todos aquellos cambios que no afectan a la secuencia de bases del ADN y que son traducidos como patrones de expresión génica específicos (Berdasco and Esteller 2010). Estos cambios son, por tanto, heredables y se cree que estas marcas pueden ser las responsables de distintos fenotipos cuando existe un genotipo común.

### 1.5.1 Estudios de asociación genética

Los estudios de asociación genética consisten en identificar variantes genéticas cuyos alelos muestren distinto grado de relación con la magnitud (cuantitativa o cualitativa) de un fenotipo óseo estudiada. Estas variantes genéticas son, por lo general, cambios de una sola base que se presentan en la población en una proporción mayor al 1%, y las denominamos polimorfismos de un nucleótido simple (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), aunque generalmente en este tipo de estudios solo se consideran las variantes cuya frecuencia del alelo menor (MAF, *minor allele frequency*) sea mayor del 5%. Estos cambios generalmente tienen un impacto mínimo sobre los sistemas biológicos, sin embargo pueden tener consecuencias funcionales cuando provocan un cambio de aminoácido, cambios en la estabilidad de mensajeros, cambios en la afinidad por el sitio de unión de un factor de transcripción, o cambios en sitios susceptibles de metilación (Bush and Moore 2012).

En general, los resultados obtenidos hasta la fecha, señalan a genes pertenecientes a unas pocas rutas biológicas: la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, ruta endocrina de los estrógenos, la ruta RANKL/RANK/OPG, la ruta de osificación del hueso, la de diferenciación de las células madre mesenquimales, la de diferenciación de osteoclastos y la ruta de TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) (Richards *et al.* 2008; Rivadeneira *et al.* 2009; Stykarsdottir *et al.* 2009; Estrada *et al.* 2012; Hsu and Kiel 2012). Muchas de las variantes significativas detectadas en estudios globales son nuevas y de relación con el hueso todavía desconocida.



### 1.5.1.1 Estudios de gen candidato

La aproximación de estudio a partir de hipótesis previas con genes candidatos supone una buena aproximación para el estudio de la asociación de genes a DMO. En este tipo de estudio se analizan variantes polimórficas en genes que por su función podrían estar relacionados con los procesos implicados en la pérdida de masa ósea y la aparición de fenotipos óseos patológicos. En nuestro caso los genes candidatos son aquellos genes que regulan el metabolismo óseo y citoquinas cuya implicación en el metabolismo óseo es bien conocida desde hace tiempo (Ralston and Uitterlinden 2010).

Este tipo de aproximación tiene una serie de limitaciones obvias, como el coste elevado, el bajo poder estadístico, y que sólo se explica un porcentaje muy pequeño de la varianza fenotípica total (Uitterlinden *et al.* 2006; Ralston and Uitterlinden 2010). No obstante, estos estudios proveen a la comunidad científica de la habilidad de trabajar sobre hipótesis previas. Para paliar la limitación del bajo poder estadístico debido al pequeño tamaño muestral, hay organismos como el Consorcio GENOMOS (<http://www.genomos.eu/>) que han realizado estudios de genes candidatos a gran escala (Alonso and Ralston 2014).

Mediante este tipo de aproximación se han estudiado unos 150 genes candidatos, de los cuales los más estudiados a día de hoy son el gen del receptor 1 de estrógenos (*ESR1*), el gen para el colágeno tipo I- $\alpha$ -1 (*COL1A1*) y el gen para el receptor de la vitamina D (*VDR*), para los que se ha establecido una clara asociación a DMO (Ralston 2002; Colin *et al.* 2003; Jin *et al.* 2009; Rivadeneira *et al.* 2009).

Otros genes estudiados son el gen para el receptor del péptido relacionado con la PTH (*prPTH*) (Zelzer and Olsen 2003; George *et al.* 2014), el gen de la IL-6, el del TGF- $\beta$ 1 (Ralston 2003), el gen que codifica para el receptor de leptina, el de la osteoprotegerina, TNF- $\alpha$  o LRP5 (Gong *et al.* 2001; Baldock and Eisman 2004), entre otros.

### 1.5.1.2 GWAS

El desarrollo de nuevas técnicas de genotipado, la mejor caracterización de las cohortes de pacientes y el avance en el proyecto HapMap (2003)

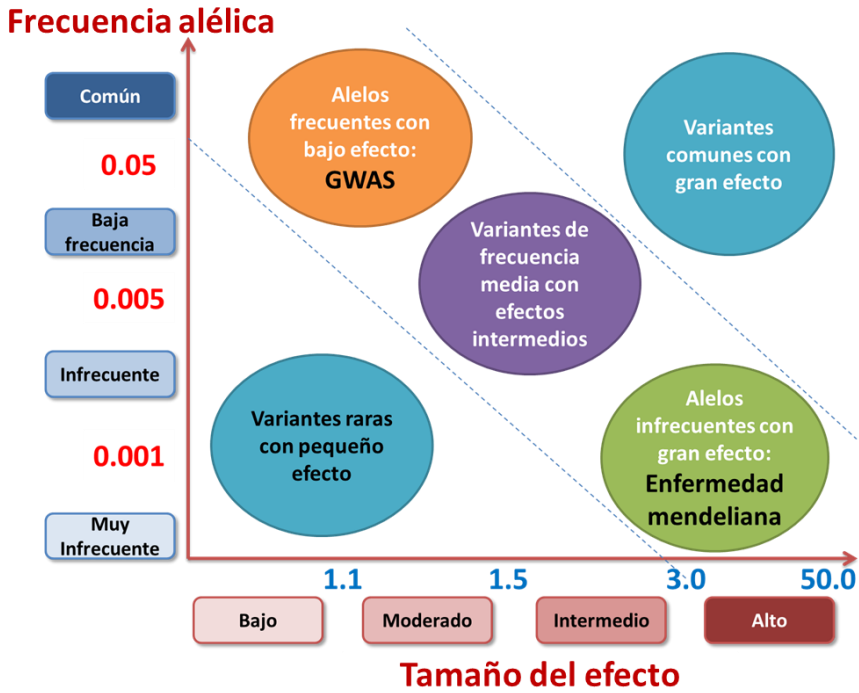
permitió llevar a cabo proyectos de genotipado a gran escala a nivel de genoma completo (GWAS, *genome-wide association study*).

Los GWAS son estudios de asociación en los que no se parte de una hipótesis previa y en general se estudian miles de individuos. Para ello se genotipan centenares de miles de variantes genéticas dependiendo del tipo *microarray*. Gracias a esta aproximación a gran escala, se puede encontrar la asociación de variantes genéticas repartidas por todo el genoma e identificar rutas biológicas relacionadas con la enfermedad totalmente insospechadas *a priori*. Este tipo de estudio aumentó exponencialmente el número de genes asociados a osteoporosis y fenotipos óseos, postulándose como importantes rutas de regulación del metabolismo óseo las vías de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, RANK-RANKL-OPG o la de GPR98, entre otras (Urano and Inoue 2014a).

A pesar de las ventajas que ofrece esta aproximación a gran escala, el porcentaje de la varianza fenotípica total que se ha logrado explicar hasta ahora mediante los *loci* descubiertos en los GWAS es muy pequeño para prácticamente todas las patologías complejas y en particular para la osteoporosis.

En este sentido se han realizado varios estudios a gran escala a fin de caracterizar esa heredabilidad perdida. El estudio más amplio realizado a día de hoy analizó 56 GWAS de asociación con DMO, realizando un meta-análisis. Este estudio reveló que los genes asociados explicaban menos del 6% de la varianza genética total (Hsu and Kiel 2012).

La explicación para esta heredabilidad perdida podría encontrarse en una heterogeneidad genética, la influencia de variantes raras (Figura 12), variaciones estructurales, variaciones epigenéticas, interacciones entre genes o interacciones gen-ambiente (Manolio *et al.* 2009).



**Figura 12.** Odds ratio para cada posibilidad de identificación de variantes genéticas por el riesgo alelo frecuencia y la fuerza de efecto genético [modificado de (Manolio *et al.* 2009)].

### 1.5.1.3 Importancia de la replicación de los estudios de asociación

En los estudios de asociación, particularmente en la aproximación de genoma completo, la variante causante permanece por lo general sin identificar, por eso es importante replicar los resultados en múltiples cohortes para descartar falsos positivos.

Sin embargo, la fuerza de la asociación de una variante determinada a un fenotipo muestra una alta heterogeneidad entre diferentes estudios, incluso entre estudios llevados a cabo en poblaciones aparentemente similares (Ioannidis *et al.* 2001).

Por este motivo, la replicación de los resultados de asociación en cohortes diferentes supone un paso fundamental, ya que, de esta forma, se

refuerza mucho la significatividad de los resultados originales (Uitterlinden *et al.* 2006).

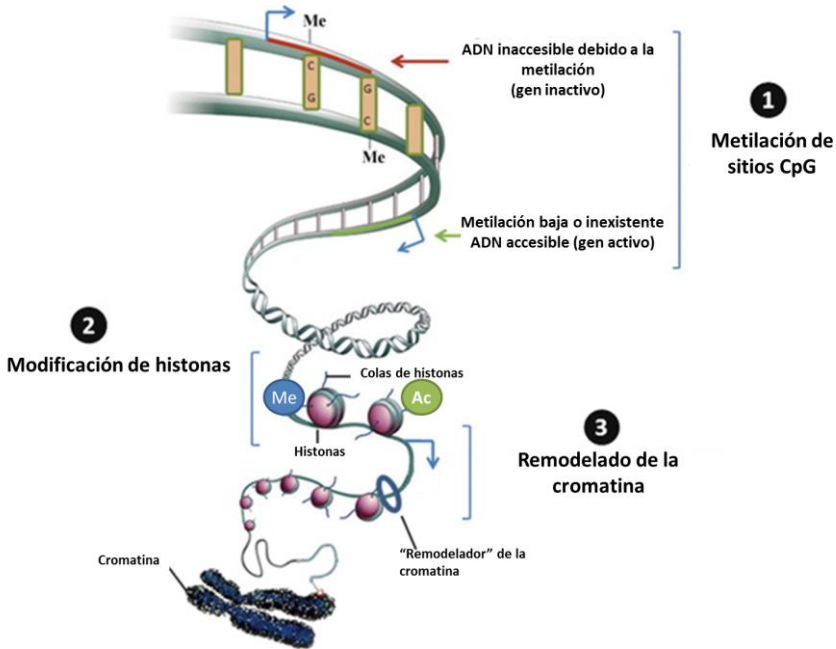
### **1.5.2 Regulación epigenética en la homeostasis ósea**

La Epigenética es una disciplina relativamente reciente que debe su auge a los estudios en el campo de la Oncología, ya que gran parte de las desregulaciones de genes que se dan en cáncer tienen que ver con procesos epigenéticos (Martín-Subero and Esteller 2017).

Este campo de estudio intenta explicar la transmisión de fenotipos estables sin alteración de la secuencia de ADN, que se producen como resultado de una interacción del genoma con el ambiente interno y externo (Martín-Subero and Esteller 2017). Para ello se depositan unas marcas epigenéticas en la cromatina y estas pueden ser distintas y dar distintos fenotipos aun tomando como base un genotipo común. Estas marcas permiten a las células activar o reprimir la expresión génica bajo determinadas condiciones ambientales, por lo que si desaparece el estímulo inductor, las marcas pueden desaparecer (Figura 13).

Entre los mecanismos epigenéticos destacan fundamentalmente la metilación del ADN, la modificación de histonas, el remodelado de la cromatina y los microRNAs (miRNAs) (Guil and Esteller 2009).

La metilación del ADN es posiblemente la marca epigenética más estudiada y está asociada al silenciamiento transcripcional. La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina de los dinucleótidos CpG (5mC), catalizado por una ADN metiltransferasa (Berdasco and Esteller 2010). Los sitios CpG no están distribuidos al azar a lo largo del genoma, sino que siguen un patrón determinado (Daniel *et al.* 2011). Existen además unas regiones con una alta concentración de sitios CpG, denominadas islas CpG y normalmente se encuentran en las regiones promotoras de los genes codificantes para proteínas (Ghayor and Weber 2016).



**Figura 13.** Principales mecanismos epigenéticos. 1) Los grupos metilo unidos a las cisteínas de las islas CpG regulan la actividad génica. Por lo general, la metilación inhibe la expresión del gen. 2) Los grupos unidos a las colas de histonas determinan, en última instancia, la estructura de la cromatina y por tanto la actividad del ADN flanqueante. 3) El remodelado de la cromatina favorece o dificulta la disponibilidad de ciertas regiones del ADN para la transcripción (modificado de (Rajender *et al.* 2011)).

Aunque se ha visto que en torno al 60%-80% de sitios CpG del genoma están metilados, fundamentalmente para dar estabilidad a la cromatina, en las islas CpG este porcentaje es muchísimo menor, permaneciendo por lo general como zonas sin metilar (Bird 2002), de hecho, la metilación de estos sitios en general se asocia al silenciamiento transcripcional del gen. Existen dos mecanismos aceptados para explicar este efecto. Por una parte, la 5mC inhibe la unión de ciertos factores de transcripción que contienen secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento (por ejemplo: E2F, CREB, o NFκB, entre otros). Por otra parte, siendo el mecanismo más general, existen proteínas que reconocen específicamente CpGs metiladas y reclutan co-represores de la cromatina tipo histonas desacetilasas como por ejemplo MeCP2, o MBD1, entre otras (Delgado-Calle *et al.* 2012).

Diversos estudios han sugerido que la metilación del ADN pueda estar jugando un papel fundamental en la diferenciación osteoblástica. Además, es importante en la comunicación entre el OB y el OC, afectando a genes tanto activadores como represores de la actividad osteoclástica, y modula la transición OB-osteocito, por lo que su implicación en la regulación de la homeostasis ósea es más que evidente (Ghayor and Weber 2016).

Otro mecanismo de regulación de la expresión génica es la modificación química de histonas. En eucariotas, el ADN está acomplejado con histonas, lo que le confiere compactación y lo organiza en nucleosomas. Estas modificaciones se localizan en la cola de las histonas, la porción N-terminal que está accesible hacia el exterior del nucleosoma y es la que interacciona con el ADN.

La modificación química de histonas, que se ha venido en denominar código de histonas, tiene como objetivo el de modificar el estado de la cromatina hacia el estado de heterocromatina, estado más denso y compactado y menos accesible a la unión de factores de transcripción, o hacia la eucromatina, que por el contrario es la forma accesible y transcripcionalmente activa. Podemos dividir, por tanto, estas modificaciones entre las que favorecen la transcripción como la acetilación o la metilación de la arginina y de algunas lisinas (H3K4 y la H3K36), y las que se relacionan con la represión como la metilación de las lisinas H3K9 y H3K27. Otras modificaciones como la fosforilación, la ubiquitinación, y la sumolización tendrían efectos diversos (Delgado-Calle *et al.* 2012).

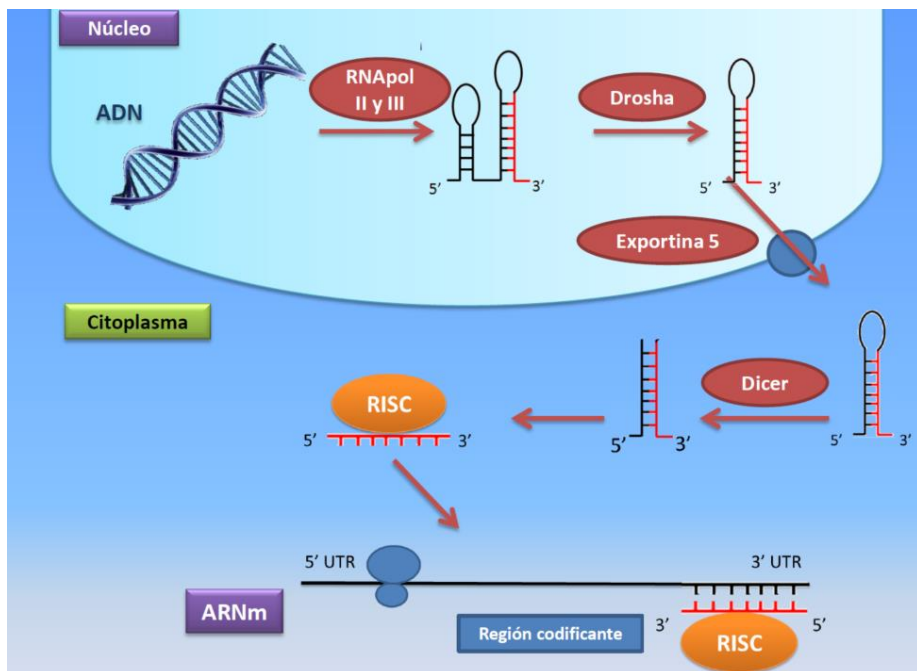
Estas marcas son mutuamente excluyentes para un residuo de aminoácido dado (p.e. la lisina 9 de la histona 3 [H3K9] puede ser acetilada o metilada, pero no ambas cosas). Un desafío importante de la era postgenómica es entender su efecto tanto individual como combinado sobre la expresión génica (Brookes and Shi 2014).

El remodelado de la cromatina es un proceso asistido por enzimas para facilitar el acceso al ADN nucleosómico mediante el remodelado de la estructura, composición y posicionamiento de los nucleosomas, desenrollamiento transitorio del ADN o la formación de lazos de ADN. Como consecuencia de estos cambios se produce una regulación del acceso al ADN

de las proteínas que interaccionan con él. Este proceso sucede en paralelo a la modificación de histonas y/o factores de transcripción. Los remodeladores de cromatina, en general, hidrolizan ATP para realizar su función (Brookes and Shi 2014).

Gran parte del ARN transcrito no es traducido a proteínas, es lo que se conoce como ARN no codificante y juega un papel fundamental en la regulación génica a nivel transcripcional y post-transcripcional. De entre estos ARNs no codificantes destacan los micro-RNAs (miRNAs) que presentan entre 20-24 nucleótidos de longitud y están involucrados en las funciones biológicas normales que incluyen proliferación y apoptosis (Bartel 2004).

Estos miRNAs en general se encargan de regular negativamente la expresión génica modulando directamente la expresión de los ARN mensajeros mediante la formación de complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC, *RNA-induced silencing complex*), lo que conduce a la represión traduccional o incluso a la escisión del ARN mensajero diana (He and Hannon 2004) (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema del proceso de síntesis de un miRNA.

Brevemente, las RNA polimerasas II y III transcriben, a partir del ADN, un miRNA primario (pri-miRNA) de unos 0.5-7kb. Este pri-miRNA se pliega en una estructura de horquilla única o múltiple y esta estructura es escindida por la enzima Drosha, una RNAsa nuclear. De esta escisión se obtiene un fragmento largo y uno más corto (de unos 60-70 nucleótidos). Este último se llama miRNA precursor (pre-miRNA) y es el segmento transportado a través de la membrana nuclear por parte de la Exportina 5.

Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA sufre una nueva escisión por parte de una segunda RNAsa denominada Dicer. De este proceso se obtienen el miRNA maduro de unos 20 nucleótidos, que es incorporado al complejo RISC que contiene proteínas de la familia denominada Argonauta que se unen al miRNA. El complejo RISC se encarga de degradar la otra hebra del dúplex.

La formación de este complejo tiene como objetivo reprimir la expresión del ARN mensajero. El complejo RISC se une a determinadas secuencias de la región 3' UTR del ARN mensajero diana pudiendo inhibir su traducción o bien degradar el propio mensajero, en función de la complementariedad entre el miRNA y su diana (Bartel 2004).

Cada miRNA puede tener múltiples genes diana, y cada gen puede, a su vez, estar regulado por más de un miRNA. Aunque aún no están del todo bien caracterizados, ya se han descrito más de 2500 miRNAs en humanos (Bracken *et al.* 2016), y va en aumento ya que se ha estimado que los miRNAs puedan estar implicados en la regulación del 60% de los genes codificantes (Friedman *et al.* 2009).

Las investigaciones en los últimos años están prestando cada vez más atención a las alteraciones en los mecanismos epigenéticos que subyacen no solo en procesos neoplásicos, sino también en otras patologías complejas (Brookes and Shi 2014). En el caso de los miRNAs, la primera relación entre la desregulación de sus niveles y la patología se llevó a cabo en leucemia de células B (Calin *et al.* 2002). Así pues, se están estudiando los niveles de miRNAs circulantes como biomarcadores de varios tipos de cáncer. Esto ha revelado su importancia diagnóstica y su potencial de pronóstico (Kosaka *et al.* 2010).



El papel de estos miRNAs en enfermedades esqueléticas no se conoce aún en profundidad, aunque las funciones de algunos de ellos y la desregulación de los mecanismos mediados por miRNAs están emergiendo como un factor patológico importante tanto en la regulación normal como en la patología ósea (Lian *et al.* 2012).

### **1.5.3 Caracterización funcional de las variantes genéticas asociadas a DMO**

Las variantes genéticas que han sido identificadas como asociadas a fenotipos óseos pueden ser, o no, una de las causas biológicas de la asociación. Por tanto, siempre son necesarios los estudios funcionales para explorar la posible función de las variantes asociadas detectadas. Así, para variantes situadas en los exones, la tarea es relativamente sencilla, teniendo en cuenta que es muy simple determinar si la variante altera la secuencia de aminoácidos de la proteína. En cualquier caso, el cambio de un aminoácido no lleva implícito un cambio en la función y también se deberían realizar estudios funcionales. La dificultad aumenta considerablemente cuando se quiere definir mecanismos funcionales para alelos de pequeño efecto, fundamentalmente porque la variante causal es difícil de identificar.

En el caso de la aparición de variantes asociadas que se encuentran en intrones, promotores, o regiones intergénicas se recurre a la búsqueda en bases de datos como ENCODE (<http://www.genome.ucsc.edu/encode/>), que construye una lista de elementos reguladores funcionales del genoma humano. A pesar de la utilidad de estas bases de datos, la importancia de las variantes genéticas puede diferir entre los diferentes tipos de células, y los datos sobre las células óseas son aún pobres, por lo que se debe recurrir a estudios funcionales *in vitro* (Alonso and Ralston 2014).

Existen múltiples aproximaciones para caracterizar la funcionalidad de un alelo de efecto pequeño sobre el fenotipo. Los estudios *in silico*, por ejemplo, que se basan en el uso de herramientas predictoras de los efectos de la variante genética sobre la estructura de la proteína o estudios basados en la biología celular (expresión de diferentes variantes *in vitro*, estudios “*knock-*

*in*”, etc.). Otra posibilidad serían los estudios del efecto de los alelos sobre la expresión génica *in vivo*, o bien aproximaciones sencillas para determinar la funcionalidad como los ensayos EMSA y de gen reportero (Ralston and Uitterlinden 2010).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La osteoporosis y su consecuencia clínica más grave, la fractura ósea, constituyen un grave problema de salud pública mundial. La osteoporosis es especialmente prevalente entre mujeres postmenopáusicas a causa de la deficiencia de estrógenos, que rompe el equilibrio entre formación y resorción ósea a favor de ésta última. Como se ha visto, la regulación de la homeostasis ósea se lleva a cabo a través de diversas rutas y es llevada a cabo por varios sistemas, entre los que destaca el Sistema Inmune.

La osteoporosis es una patología multifactorial con un componente genético aún mal caracterizado, y es que globalmente aún no se explica más del 10% de la varianza fenotípica total, a pesar de que se han realizado costosos estudios de asociación a gran escala y meta-análisis. Para caracterizar esta heredabilidad perdida se necesitan nuevas aproximaciones genéticas al estudio de la osteoporosis, como son el estudio de variantes raras y estructurales, el estudio de la interacción gen-gen o gen-ambiente, así como estudios de los mecanismos epigenéticos que puedan estar influyendo en esta varianza fenotípica.

Nuestra **hipótesis** es que existen todavía decenas de genes por caracterizar asociados a estos fenotipos óseos que pueden identificarse desde el campo de la osteoinmunología y a través de modelos animales y celulares mediante aproximaciones traslacionales. Destacar también la importancia de los mecanismos epigenéticos, principalmente metilación del ADN y perfiles de miRNAs, para ayudar a explicar esta heredabilidad perdida y para la obtención de biomarcadores de estos fenotipos óseos.

Los **objetivos generales** de esta Tesis Doctoral van dirigidos a aclarar los mecanismos genéticos que regulan la aparición de la osteoporosis postmenopáusica, así como los factores séricos y genéticos de susceptibilidad que subyacen a la fractura por fragilidad, intentando esclarecer el papel del sistema *CD40/CD40L* en estos procesos.

Son **objetivos específicos**:

1. Diseñar modelos animales y celulares que permitan la identificación de nuevos genes candidatos para su estudio traslacional en el humano.
2. Caracterizar nuevos genes asociados a Densidad Mineral Ósea (DMO) mediante el análisis de genes candidatos seleccionados a partir de datos previos, genes del sistema inmune o implicados en la homeostasis ósea o bien genes obtenidos a partir de nuestros modelos animales o celulares.
3. Estudiar la funcionalidad de las variantes génicas asociadas a DMO, mediante la cuantificación de la expresión génica dependiente de alelo y el grado de metilación de regiones reguladoras.
4. Esclarecer el papel del sistema CD40/CD40L en la producción de osteoprotegerina (OPG) y la posible implicación de la célula B en este proceso.
5. Identificar nuevos biomarcadores asociados al riesgo de fractura por fragilidad, mediante la caracterización de su perfil bioquímico y de miRNAs.

# 3. METODOLOGÍA





Para facilitar la lectura de este trabajo de Tesis Doctoral se han usado abreviaturas comúnmente aceptadas en el ámbito científico, generalmente el acrónimo o siglas en inglés. El significado de estos términos puede ser consultado en el apartado “Abreviaturas”. Se ha optado por emplear el vocablo inglés para terminología específica, en aquellos casos en que su uso está extendido y/o su uso ayuda a la comprensión del texto.

Respecto a los reactivos utilizados, de no especificarse lo contrario, se entenderá que han sido adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Luis, Misuri, EEUU).

### **3.1 Poblaciones de estudio**

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han estudiado dos cohortes de mujeres diferentes. La primera de ellas, que se ha denominado “Cohorte Densidad Mineral Ósea” o “Cohorte DMO”, se estableció en 2005, momento a partir del cual se comenzó a reclutar mujeres que acudían a la Unidad de Menopausia del Hospital Clínico Universitario de Valencia solicitando servicios de salud relacionados con el climaterio y a la cual, a día de hoy, todavía se siguen incorporando mujeres desde esta consulta. Esta cohorte reclutó asimismo mujeres de la Consulta de Menopausia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia durante los años 2012-2016 que representan el 20% de la cohorte.

La otra cohorte que se ha estudiado en el presente trabajo es la que se ha denominado “Cohorte Fractura”, establecida en 2012 a partir de mujeres intervenidas en el Hospital Clínico por una fractura de cuello de fémur por fragilidad (pacientes consideradas “casos” en esta cohorte), o bien debido a cirugía de reemplazo de la cadera por una coxartrosis (pacientes “controles”).

En el presente trabajo se incluyen estudios realizados a lo largo de estos últimos años, por lo que el tamaño muestral puede variar en cada estudio particular como consecuencia de la entrada continua de mujeres a la cohorte, así como por la adición de nuevos datos a la misma. Por este motivo, se presenta primero una descripción completa de las cohortes generales, siendo

luego especificadas las distintas variables y características en las cohortes particulares de cada uno de los estudios presentados.

### **3.1.1 Cohorte DMO**

La Cohorte DMO está compuesta por 1166 mujeres de ascendencia española, residentes en Valencia, que fueron reclutadas consecutivamente desde 2005 hasta la actualidad al solicitar servicios de salud relacionados con el climaterio en distintas Unidades de Menopausia. La mayoría de ellas (N= 819) se reclutaron entre 2005-2009 en el Hospital Clínico, y las restantes (N= 347), en el Hospital Dr. Peset. Ambos centros se ubican en la capital y cubren un área urbana de clase media (ANEXO I).

El procedimiento de reclutamiento ha sido idéntico desde que se iniciaron los estudios. Dada la naturaleza de la consulta, las mujeres acudían a la misma por problemas relacionados con el climaterio, por lo que, tal y como se verá más adelante, las mujeres de nuestra cohorte muestran, en general, un estado óseo normal para su edad. Durante la consulta se les explicó detalladamente en qué consistían los estudios y se les invitó a participar en los mismos.

A las mujeres participantes se les proporcionó un consentimiento informado, con el que tomaron conciencia de los ensayos que se estaban llevando a cabo y de que cedían sus muestras para este fin, dando también su consentimiento para que éstas pudieran ser utilizadas en el futuro en nuevos estudios del grupo relacionados con la salud femenina.

Ya que el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha estado ligado a varios proyectos de investigación, durante el mismo se han utilizado varios modelos de consentimiento informado, siendo todos ellos aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA), de tal manera que, si las mujeres lo consideraban oportuno, aceptaban, mediante la firma del mismo, su participación en la investigación. Se puede consultar el consentimiento informado del último proyecto FIS en el ANEXO II.

Todas las mujeres participantes se sometieron a una exploración física rutinaria, así como a una analítica general básica, determinándose que todas ellas fueran mujeres sanas. Además, debía tratarse de pacientes no bebedoras, considerándose como tal si no tomaban alcohol o lo hacían moderadamente con las comidas (menos de 5g/día). Por otra parte, se les realizó una entrevista en la que se les preguntaba por cuestiones relativas a la osteoporosis y/o medicación.

Una vez incluidas en el estudio, lo primero fue caracterizar su estatus menopáusico para lo que se establecieron los criterios que figuran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Criterios de clasificación de las mujeres según su estatus menopáusico.

PRE-MENOPÁUSICA	PERI-MENOPÁUSICA	POSTMENOPÁUSICA	
		Natural	Quirúrgica
Menstruación normal o lapso de tiempo de amenorrea inferior a los 6 meses.	Menstruación irregular con un lapso de amenorrea de, al menos, 6 meses desde la última menstruación regular.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amenorrea de, al menos, un año.</li> <li>• Niveles de FSH &gt;40UI/ml.</li> <li>• Mujeres mayores de 35 años.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ooforectomía bilateral previa a la menopausia.</li> <li>• Mujeres mayores de 35 años.</li> </ul>

Según el tipo de estudio realizado pudieron incluirse las mujeres premenopáusicas, entendiéndose que están en el periodo reproductivo anterior a la menopausia en que la menstruación aún es regular, y también las mujeres peri-menopáusicas, entendiéndose la perimenopausia como el primer año de climaterio.

Los criterios de exclusión para formar parte de la Cohorte DMO se detallan a continuación:

- Presentar inmovilidad.

- Padecer una enfermedad ósea distinta a osteoporosis primaria o bien enfermedades metabólicas que cursen con osteoporosis secundaria (artritis reumatoide, cáncer...).
- Haber sido tratada con algún fármaco con efecto conocido sobre la masa ósea, o el metabolismo mineral (como, por ejemplo, corticoides o anticonvulsivos). La toma de suplementos de calcio y de vitamina D3, o bien el uso de Terapia Hormonal Sustitutiva no se consideró un criterio de exclusión.
- Ser menor de 35 años.
- No haber firmado el consentimiento informado.

### **3.1.2 Cohorte Fractura**

La Cohorte Fractura, en el momento de redactar el presente trabajo, estaba formada por 96 mujeres caucásicas residentes en el área de salud correspondiente al Hospital Clínico. Para la formación de la misma se reclutaron mujeres que acudieron al Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico a causa de una fractura subcapital de cadera considerada fractura osteoporótica debida a fragilidad (casos del estudio) o bien, mujeres con una osteoartritis severa de cadera que requirió la implantación de una prótesis (controles del estudio).

En esta consulta el facultativo que iba a intervenirlas se encargó de informar debidamente a las pacientes de la naturaleza de la cohorte, así como los estudios que se estaban llevando a cabo a partir de las muestras de las que ya se disponía, y se invitó a las mujeres a participar en los estudios mediante la firma de un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

Los criterios de exclusión para formar parte de la Cohorte Fractura se detallan a continuación:

- Tener un historial previo de enfermedad ósea distinta de osteoporosis primaria u osteoartritis.

- Presentar fracturas debidas a un traumatismo de alta energía.
- Haber sido tratadas con algún fármaco con efecto sobre el metabolismo óseo.
- Haber sufrido cáncer.
- Ser menor de 50 años.

Cuando se intervino a estas pacientes para reemplazar la cadera fracturada y/o artrósica por una prótesis, la cabeza femoral se depositó en un frasco estéril y se guardó a 4°C. En el momento de la intervención, dado que las mujeres se encontraban en ayuno, se les realizó una extracción de sangre, y las muestras se almacenaron junto al hueso a 4°C en el propio quirófano hasta que finalizó la intervención, momento en el que se recogieron y se procesaron en el laboratorio.

### **3.2 Caracterización del estado bioquímico, antropométrico y óseo de las cohortes**

En el caso de la Cohorte DMO, una vez seleccionadas las pacientes y firmado el consentimiento informado, se citaron nuevamente en ayunas con el fin de realizarles una extracción sanguínea y una entrevista sobre su historia clínica, en la que les preguntó por la edad, edad de la menarquia, su estatus menopáusico (pre-, peri- o postmenopáusica), en su caso edad de la menopausia, el tipo de menopausia (natural/quirúrgica), número de gestaciones y partos, consumo de alcohol y tabaco, y si eran o habían sido usuarias de terapia hormonal (TH), así como la duración de la misma. En esa misma visita se tomaron datos antropométricos como el peso y la altura. Todos estos datos se contrastaron con los disponibles en las historias clínicas de las mujeres participantes en la medida de lo posible.

Con estos datos, se calculó el índice de masa corporal (IMC), como la relación entre el peso (kg) y el cuadrado de la altura (m<sup>2</sup>) y se estimaron los años desde la menopausia (ADM). También se estableció si la densitometría

había sido precedida de toma de TH, y en su caso, el tiempo de duración del tratamiento, y se clasificó a las mujeres participantes según su estatus menopáusico, para los estudios de asociación genética.

El caso de las mujeres que forman parte de la Cohorte Fractura fue ligeramente diferente, dado que las mujeres no acudieron a la consulta de Menopausia, sino que fueron reclutadas por el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología al presentarse en Urgencias debido a una fractura de cadera o bien, al serles programada una cirugía de reemplazo de cadera a causa de una coxartrosis. Por este motivo, la entrevista para conocer detalles de la historia clínica se realizó el mismo día que se les programó la intervención, por parte del cirujano encargado de la misma, y la extracción sanguínea se realizó ese mismo día.

En ambos casos, por tanto, se obtuvieron muestras sanguíneas en condición de ayuno en el propio quirófano, en el momento inmediatamente anterior a la intervención. Se extrajeron dos tubos de cada paciente, uno seco para la obtención de suero y otro anticoagulado con EDTA di-sódico para la obtención de plasma, así como la fracción celular de leucocitos que se usó para extraer ADN de las participantes. Con el suero y/o plasma se realizaron las distintas determinaciones bioquímicas y hormonales (ver más adelante), aunque una parte del suero y/o plasma se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar otras determinaciones posteriormente.

Además, a cada participante se le realizó un estudio densitométrico tanto de cuello femoral como de columna lumbar mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA, ver apartado 3.2.4).

### **3.2.1 Datos obtenidos del laboratorio central de Bioquímica Clínica**

En ambas cohortes se realizaron determinaciones rutinarias para conocer el estado de salud general y el estado óseo en particular. Las determinaciones

se llevaron a cabo en muestras séricas mediante métodos de rutina usando analizadores automatizados de los laboratorios centrales. Estas determinaciones incluyeron marcadores bioquímicos generales (marcadores de perfil lipídico: LDL (mg/dl), HDL (mg/dl), colesterol (mg/dl), y triglicéridos (mg/dl); glucosa (mg/dl); marcadores bioquímicos de homeostasis y remodelado óseo: fosfato (mg/dl), calcio total (mg/dl), fosfatasa alcalina total (FA, U/L), y hormona paratiroidea intacta (PTH, pg/ml).

Los niveles de la isoforma ósea de la fosfatasa alcalina (FAO,  $\mu\text{g/L}$ ) se determinaron por un inmunoensayo por quimioluminiscencia (DiaSorin Inc.; Stillwater, MN, EEUU).

Los niveles del telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (CTX, ng/ml), osteocalcina (ng/ml), 25- hidroxicolecalciferol (25-OH-vitamina-D3, ng/ml), y estradiol (pg/ml), se determinaron mediante electroquimioluminiscencia (autoanalizador E170 Modular Analyser; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

### **3.2.2 Obtención de muestras**

Para ambas cohortes la obtención de muestras fue similar, obteniéndose dos tubos de sangre (uno seco y uno anticoagulado) tras un periodo de ayunas de, al menos, 12 horas tal como se ha especificado en el apartado 0. Específicamente, las muestras de la Cohorte DMO se obtuvieron a partir de una extracción sanguínea realizada entre las 8 y las 10 de la mañana, mientras que en el caso de la Cohorte Fractura la toma de muestras se realizó durante la intervención, en el propio quirófano.

Los tubos se centrifugaron en una centrífuga clínica (Universal 320R Hettich, Alemania) a 1500xg durante 10 minutos para separar suero y plasma. Tras esta primera centrifugación, se recogieron el suero y el plasma, se alicuotaron, y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

Para la obtención de ADN y/o ARN, se lisaron los hematíes del tubo no coagulado usando un tampón de lisis a base de cloruro amónico ( $\text{KHCO}_3$  10

mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4). Este tampón lisa la fracción no nucleada de las células sanguíneas. Para ello se añadieron 5 ml de tampón al tubo conteniendo las células sanguíneas, se mezclaron y tras una centrifugación a 1500xg durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió las veces necesarias hasta que la fracción de células blancas pudiera distinguirse fácilmente en el fondo del tubo (habitualmente 3 veces). A continuación, el precipitado celular se resuspendió en PBS, se transfirió a un tubo eppendorf, y se centrifugó de nuevo en una microcentrifuga (Himac CT15RE, Hitachi Koki Co, Ltd, Japón). Una vez obtenido el precipitado de células blancas éste se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la extracción de ADN y/o ARN.

#### **A) Obtención de ADN**

La extracción de ADN genómico a partir del precipitado de células nucleadas congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  se realizó usando un kit de extracción de ADN genómico (REAL, Durviz, Valencia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este método consiste en la lisis celular mediante un detergente aniónico seguido de una precipitación salina de las proteínas. El ADN se obtuvo del sobrenadante mediante precipitación con isopropanol. Tras un par de lavados con etanol al 70%, el ADN se resuspendió en tampón TE y se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. Las muestras presentaron un ratio de absorbancia 260/280 nm entre 1.6-2.0, lo que indica alta calidad del ADN.

#### **B) Obtención de ARN**

La extracción de ARN siempre se realizó con Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante, con modificaciones y especificaciones dependiendo del tipo de tejido. El procedimiento general consta de una lisis celular mediante el reactivo Trizol, una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo consigue la separación de la fase orgánica, en la que

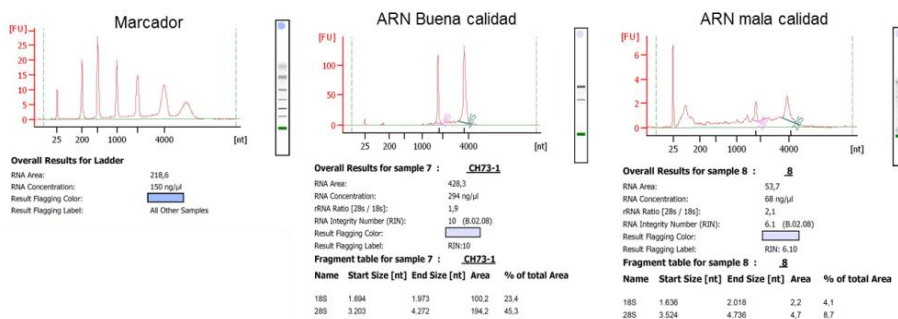


quedan retenidos lípidos y proteínas, de la fase acuosa que contiene el ARN. El ADN, por su parte, queda atrapado en la interfase. Para la obtención de ARN, éste se precipitó de la fase acuosa con isopropanol y se lavó con etanol al 75% en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), un inhibidor irreversible de RNAsas. El agua DEPC se usó para todos los procedimientos en los que se usó ARN. Tras secar ligeramente al aire el precipitado, éste se resuspendió en agua DEPC y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La determinación de la integridad del ARN se realizó mediante la plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer, (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), un equipo de análisis automatizado basado en el análisis de los fragmentos de ARN gracias a una tecnología combinada de electroforesis capilar y fluorescencia. La muestra de ARN es separada en sus fragmentos por su peso molecular y éstos son detectados mediante fluorescencia. El resultado se visualiza en un electroferograma donde la cantidad de fluorescencia medida se correlaciona con la cantidad de ARN de un tamaño determinado, tal como se observa en el ejemplo de la Figura 15.

El *software* del equipo calcula un algoritmo a partir de la información obtenida del análisis electroforético, teniendo en cuenta el electroferograma resultante y le asigna un valor de integridad de ARN (*RNA Integrity Number*, RIN), que oscila en el rango 1-10, siendo un RIN=10 una muestra intacta, y RIN=1 una muestra completamente degradada. Consideramos que un ARN está degradado si su RIN es inferior a 6, si bien en nuestros estudios no usamos muestras con un RIN inferior a 8 en ningún caso (Schroeder *et al.* 2006).

A pesar de que esta técnica determina además la concentración de ARN de las muestras, ésta fue comprobada además por espectrofotometría para asegurarnos de la concentración con dos mediciones distintas. Esta determinación se realizó utilizando el espectrofotómetro Lamda Bio (Perkin Elmer, Waltham, MA, EEUU).



**Figura 15.** Perfiles de integridad del ARN obtenidas con la plataforma Agilent. Se muestran dos muestras distintas, que ponen de manifiesto las diferencias respecto al perfil y al RIN existente entre muestras de buena y mala calidad de ARN.

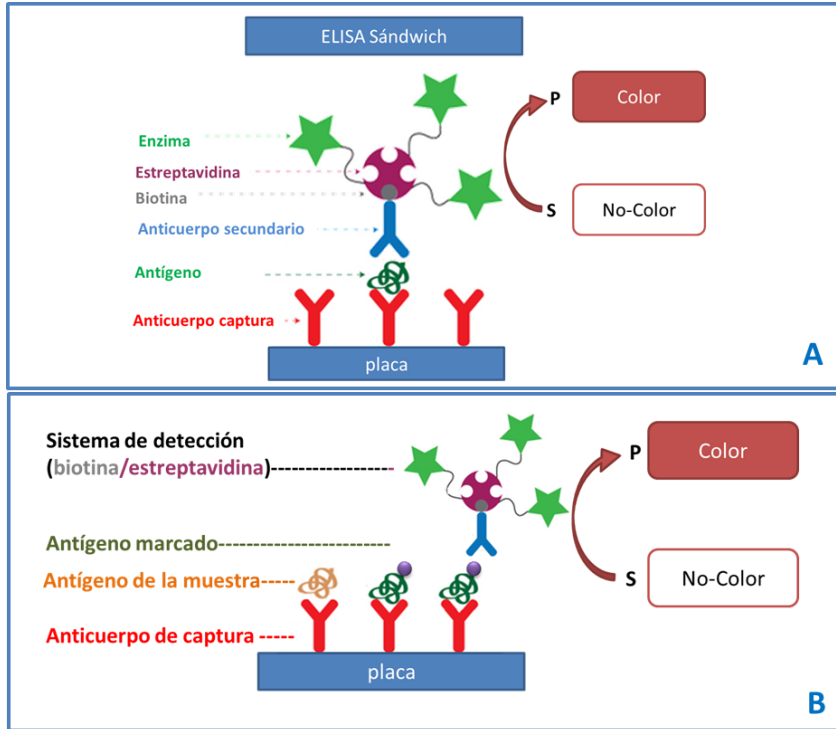
### 3.2.3 Determinación de citoquinas

En general, las determinaciones bioquímicas en suero y/o plasma de las pacientes no ofrecidas por el laboratorio central se realizaron en nuestro laboratorio mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Brevemente, un ELISA es una técnica de cuantificación que se basa en la capacidad de un anticuerpo marcado enzimáticamente de reconocer al antígeno. El anticuerpo puede ser utilizado de diversas maneras en un ensayo ELISA, según cómo se produzca el reconocimiento del antígeno y cómo se dé la reacción de detección. En este trabajo hemos utilizado fundamentalmente el ELISA tipo sándwich, que consiste en la detección del antígeno por parte de un anticuerpo inmovilizado en la placa (que se conoce como anticuerpo de captura). Este antígeno es reconocido, además, por un anticuerpo que va conjugado a biotina, lo que favorece la unión de estreptavidina, que va unida al enzima, y proporciona una reacción colorimétrica al contacto con el sustrato (Figura 16).

Alternativamente, se realizó un ELISA competitivo, en el que una cantidad conocida de antígeno marcada y una fracción de antígeno libre procedente de la muestra, compiten por un número limitado de sitios de alta

afinidad del anticuerpo. Una vez retirado el antígeno libre, la cantidad de marcaje detectado será inversamente proporcional al antígeno presente en la muestra.



**Figura 16.** Esquema de la técnica ELISA. A) ELISA tipo sándwich, en el que la presencia de color es directamente proporcional a la presencia de la molécula diana en la muestra. B) ELISA competitivo en el que la presencia de color determina la unión del antígeno marcado al anticuerpo de captura, lo que excluye la unión del antígeno procedente de la muestra, así, una mayor presencia de color revela una menor presencia de antígeno en la muestra.

Como ya se ha comentado previamente, se ensayó una batería de citoquinas en una subpoblación de la Cohorte Fractura con el fin de catalogar y detectar diferencias en determinadas citoquinas relevantes en la homeostasis ósea entre mujeres fracturadas respecto a sus controles. Para ello, se llevaron a cabo determinaciones de la concentración sérica o plasmática de una serie de parámetros indicadores de estado óseo mediante ELISA. Estas

determinaciones se realizaron siguiendo instrucciones del fabricante para cada uno de los kits.

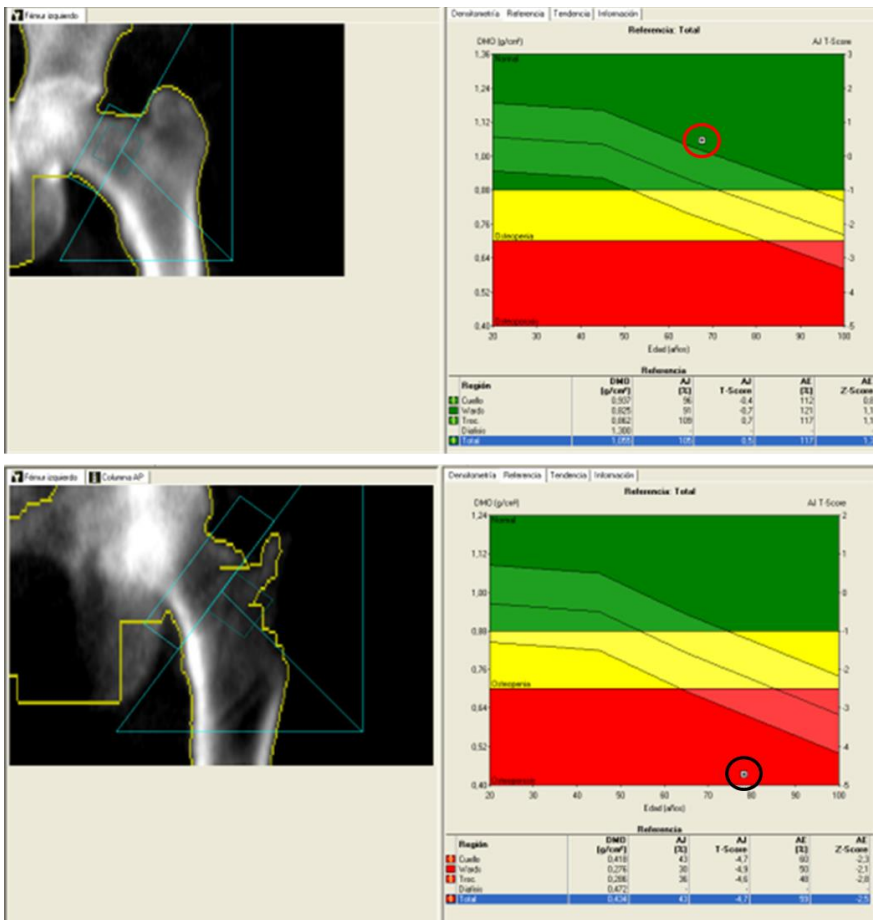
Brevemente, el nivel plasmático del Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) se ensayó con un kit de ELISA (Inmutopics; San Clemente, CA, EEUU) con un coeficiente de variación (CV) inter- e intra-ensayo de 2.4-4.7% y 1.4-2.4%, respectivamente. El nivel de Esclerostina en plasma se determinó usando un kit de ELISA (BIOMEDICA; Viena, Austria), con un CV inter- e intra-ensayo de 2-6% y 5-6%, respectivamente. El kit empleado para determinar el nivel de OPG plasmática (BIOMEDICA) presenta un CV inter- e intra-ensayo de 7% y 10%, respectivamente. El nivel sérico de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), se determinó con un kit de ELISA (R&D Systems; Abingdon, Reino Unido) con un CV inter- e intra-ensayo de 4.3-4.8% y 2.1-3.8%, respectivamente. La determinación de la concentración sérica del telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP) se llevó a cabo con un kit de ELISA (Orion Diagnostica; Espoo, Finlandia) con un CV inter- e intra-ensayo de 8-10% y 5-7%, respectivamente. Por su parte, el nivel sérico de la Leptina se determinó con un kit de ELISA (SPI BIO; Le Bretonneux-Francia) con un CV inter- e intra-ensayo de 3.2-9.2% y 3-7.5%, respectivamente. La concentración sérica de osteocalcina se determinó por un kit de ELISA (IDS; Boldon, Reino Unido) con un CV inter- e intra-ensayo de 1.3-2.2% y 2.7-5.1%, respectivamente.

Además de esta batería de citoquinas, debido a la relevancia de la Osteoprotegerina (OPG) en la regulación del metabolismo óseo, los niveles de esta proteína se determinaron en gran parte de la Cohorte DMO mediante un ELISA instantáneo (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria) con un CV inter- e intra-ensayo de 8% y 7%, respectivamente.

Todos los ensayos ELISA utilizados en esta Tesis fueron tipo sándwich, a excepción del que se realizó para detectar el telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP), que fue de tipo competitivo. En cualquier caso, las especificaciones y peculiaridades de cada tipo de ELISA se tuvieron en cuenta al realizar los cálculos pertinentes.

### 3.2.4 Determinaciones densitométricas

La cuantificación de la densidad mineral ósea (DMO) se realizó mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA) en la columna lumbar en la zona L2-L4 (DMO-CL) y en la cadera no dominante, en el cuello femoral proximal (DMO-CF), siempre que no se tratase de la cadera fracturada en el caso de la Cohorte Fractura.



**Figura 17.** Representación gráfica que proporciona un densitómetro Lunar, en la que se muestra el valor de DMO (g/cm<sup>2</sup>). Las bandas muestran las desviaciones estándar en respecto al valor medio para cada edad (Valor Z). La parte superior de la imagen muestra un fémur izquierdo normal, mientras que la inferior corresponde a un hueso osteoporótico.

Las determinaciones se realizaron mediante los densitómetros Norland XR-36 (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, EEUU), Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, EEUU) u Hologic (Hologic Explorer TM Explorer Series, Marlborough, MA, EEUU).

Como se observa en la Figura 17 el *software* de cada aparato calcula la DMO y la presenta como  $\text{g/cm}^2$ . Además, proporciona para cada medición un valor T o T-score y un valor Z o Z-score.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, dado que disponemos de DXAs procedentes de varios densitómetros diferentes, se ha calculado una DMO estandarizada (DMOe) (Hui *et al.* 1997; Lu *et al.* 2001) para poder compararlas dentro del mismo estudio, mediante unos algoritmos que se muestran en la Tabla 3. Además, en determinados estudios se ha usado la variable “tipo de densitómetro” como variable confusora (covariable) en los análisis multivariantes.

En el caso especial de los estudios realizados en la Cohorte Fractura, en que todas las pacientes disponen de una densitometría procedente del densitómetro del que dispone actualmente el Hospital Clínico Universitario (Lunar), la estandarización de la DMO fue innecesaria, y se usó el valor en  $\text{g/cm}^2$  que ofrece directamente el aparato.

**Tabla 3.** Algoritmos para la estandarización de la DMO. Según el densitómetro utilizado en la determinación, para obtener en cada caso la DMOe se deben realizar los cálculos detallados (Hui *et al.* 1997; Lu *et al.* 2001).

	DENSITÓMETRO		
	Norland	Lunar	Hologic
CF	$0.006+(0.985 \times \text{DMO})$	$-0.023+(0.939 \times \text{DMO})$	$0.019+(1.087 \times \text{DMO})$
CL	$0.9743 \times (\text{DMO}-0.969)+1.0436$	$0.9683 \times (\text{DMO}-1.100)+1.0436$	$1.0550 \times (\text{DMO}-0.972)+1.0436$

DMO: determinación de la densidad mineral ósea ( $\text{g/cm}^2$ ) para cada densitómetro

### **3.3 Estudios celulares**

#### **3.3.1 Manejo cultivos celulares**

A lo largo de esta Tesis, el trabajo con cultivos celulares, tanto de líneas inmortalizadas como cultivos primarios humanos y murinos fue un procedimiento habitual, por lo que las condiciones de trabajo cumplieron siempre los requisitos de asepsia y esterilidad deseables. Todos los procedimientos que implicaron modelos celulares se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar clase 100 (Gelaire, Milán, Italia) y los cultivos se mantuvieron en una estufa de incubación Heracell (Thermo, MA, EEUU) a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

El hecho de trabajar conjuntamente con varios tipos celulares, y que estos cultivos tuvieran que compartir espacio e infraestructuras nos hizo extremar las precauciones con los cultivos primarios especialmente, para evitar contaminaciones con otros tipos celulares.

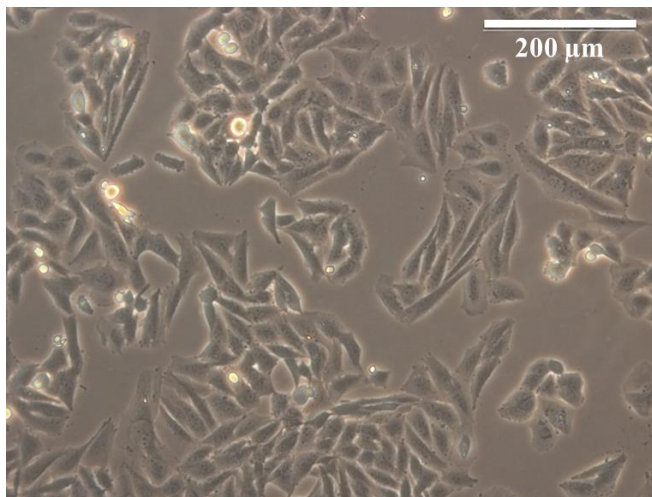
Dada la naturaleza de las células con las que hemos trabajado, cuando se requirió un medio para diferenciar osteoblastos y promover la mineralización, se utilizó la combinación de ácido ascórbico (50 µM) y beta-glicerofosfato (10 mM) (Sigma). El ácido ascórbico es necesario para la síntesis del colágeno y la osteogénesis *in vitro* y el beta-glicerofosfato eleva los niveles de fósforo inorgánico, necesario para la formación de fosfato cálcico (Maniatopoulos *et al.* 1988). En esta Tesis Doctoral, esta combinación se ha abreviado como MOG, un acrónimo de medio osteoblastogénico.

#### **3.3.2 Líneas celulares comerciales**

##### **3.3.2.1 Saos-2**

La línea celular Saos-2 es una línea comercial de osteoblastos inmortalizados procedentes de un osteosarcoma primario (*European Collection of Cell Cultures* (ECACC), comercializado por Sigma-Aldrich). Estas células pueden diferenciarse en el laboratorio a osteoblastos maduros manteniendo la capacidad de mineralizar una matriz extracelular, lo que

confiere a esta línea celular un especial interés en ensayos conducentes a evaluar la diferenciación osteoblástica humana.



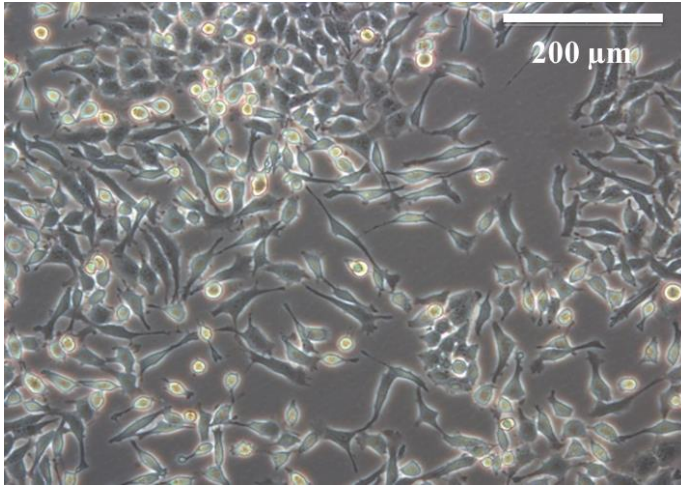
**Figura 18.** Fotografía de un cultivo de células Saos-2.

Estas células se mantuvieron en cultivo utilizando medio McCoy's 5a (Gibco, Invitrogen, California, EEUU) modificado con HEPES y suplementado al 10% con Suero Bovino Fetal (SBF; Gibco) y al 1% con antibióticos Penicilina/Estreptomicina (P/E; Gibco). Como se observa en la Figura 18, las células crecen en monocapa, y tienen una morfología similar a los fibroblastos.

### 3.3.2.2 **Hela**

La línea celular HeLa son unas células procedentes de una muestra humana de cáncer cervico-uterino, que tienen la particularidad de crecer extraordinariamente rápido, por lo que constituyen un modelo muy útil en el laboratorio. Estas células nos fueron cedidas desde el laboratorio del Dr. José Luis García (INCLIVA). Las células HeLa crecen en monocapa y requieren cultivo en medio DMEM (Gibco) suplementado con SBF (20%) y P/E (1%) (Figura 19).



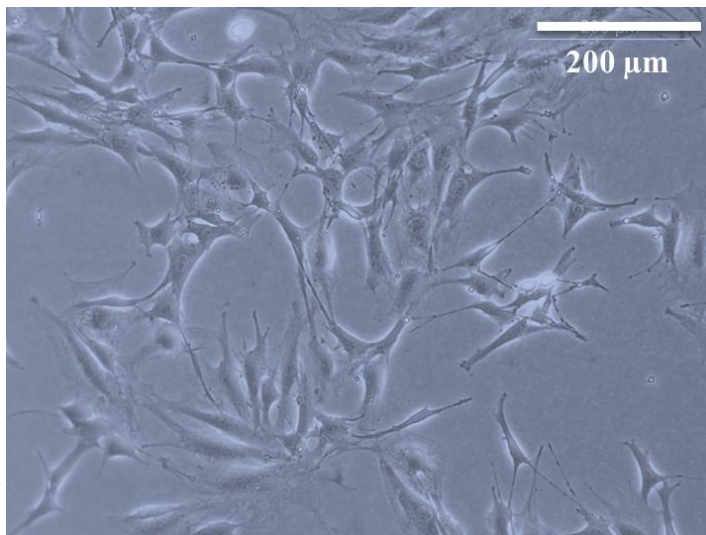


**Figura 19.** Fotografía de un cultivo de células HeLa.

### 3.3.2.3 MC3T3-E1

La línea celular MC3T3-E1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) está constituida por células pre-osteoblásticas derivadas de calvaria de ratón. Su morfología es similar a los fibroblastos y crecen formando una monocapa (Figura 20).

Estas células se mantuvieron en medio de cultivo compuesto por  $\alpha$ -MEM (Gibco) suplementado con SBF al 10% y con P/E al 1%.



**Figura 20.** Fotografía de un cultivo de células MC3T3- E1.

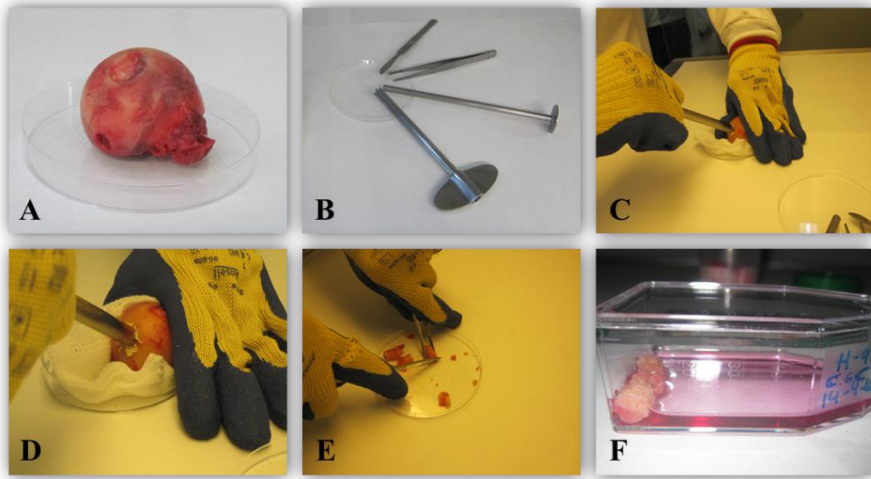
### **3.3.3 Líneas celulares primarias**

#### **3.3.3.1 Osteoblastos humanos**

Tal como se ha comentado en el apartado 3.1.2, las pacientes de la Cohorte Fractura se sometieron a una cirugía de reemplazo de su cadera por una prótesis, lo que nos dio acceso a la cabeza femoral, a partir de cual realizamos unas secciones cilíndricas con un trócar especial fabricado para este fin (Fricobe SL.), con el objetivo de obtener finalmente discos óseos de 1 cm de diámetro y aproximadamente 0.5cm de grosor.

En primer lugar, se eliminó el tejido conectivo de la muestra ósea para eliminar posibles contaminaciones con fibroblastos u otras células. A continuación, usando el trócar se obtuvieron, al menos, tres fragmentos cilíndricos de la parte central de la cabeza femoral, evitando en lo posible la zona de fractura, y se depositaron en placas Petri. El proceso puede observarse en la Figura 21. Una vez obtenidos los cilindros, se eliminó la parte cortical y se lavaron bien los cilindros con PBS suplementado al 1% con Fungizone (Gibco) para eliminar, en la medida de lo posible, los restos de médula ósea adherida.

Generalmente se extrajeron 5 cilindros por muestra, de los cuales 2 se destinaron para cultivo celular, y los otros 3 se introdujeron en criotubos y fueron inmediatamente congelados en un recipiente con nitrógeno líquido y posteriormente preservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uno de ellos se empleó para obtener ADN, otro ARN y otro se mantuvo como cilindro reserva para estudios posteriores (estos procedimientos se detallan en el apartado 3.2.2). Todas las extracciones se realizaron en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar (Telstar, Terrassa, España).



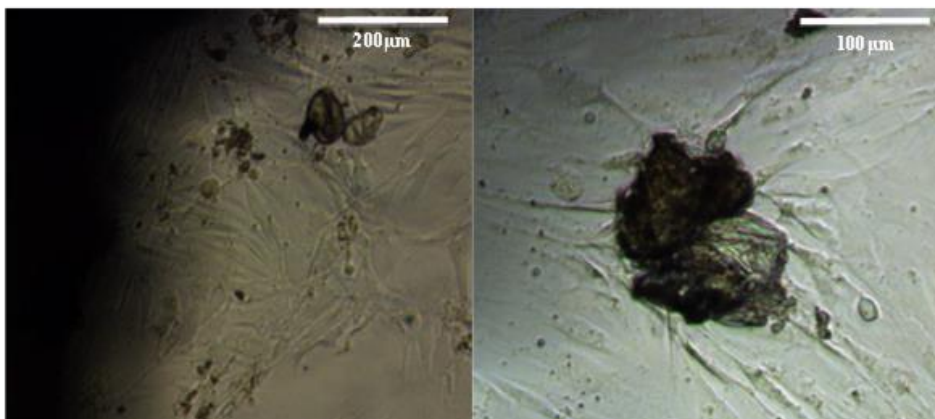
**Figura 21.** Procedimiento de extracción de cilindros a partir de la cabeza femoral. A) Cabeza femoral. B) Instrumental esterilizado mediante autoclave (Trócar, Bisturí y Pinzas). C) Extracción de los cilindros. D) Primer plano de la acción del trócar. E) Corte de los cilindros en discos. F) Cultivo de los discos de hueso.

### A) Obtención y mantenimiento de los osteoblastos primarios

Los dos cilindros destinados al cultivo para extracción de osteoblastos primarios se cortaron en secciones de unos 2-3 mm de grosor, obteniéndose unos fragmentos en forma de discos lo más finos posible. Estas láminas se depositaron en dos frascos de 25 cc para cada paciente, con el medio de cultivo adecuado (DMEM, suplementado al 20% de SBF, 1% P/E, y en estos

cultivos específicamente, 1% del antimicótico Fungizone). Se depositaron 3-4 discos por frasco de cultivo.

Una vez dispuestos los cultivos, el medio se cambió cada 7 días. Generalmente, los primeros osteoblastos suelen aparecer a los 10-12 días, en las inmediaciones de los discos óseos depositados (Figura 22). La velocidad de crecimiento de estos cultivos es muy variable, no obstante, como media tardan alrededor de 3-5 semanas en conseguir la confluencia.



**Figura 22.** Imagen de microscopía óptica del cultivo primario de osteoblastos. En las imágenes se observa la migración de los osteoblastos desde el interior óseo hacia el exterior.

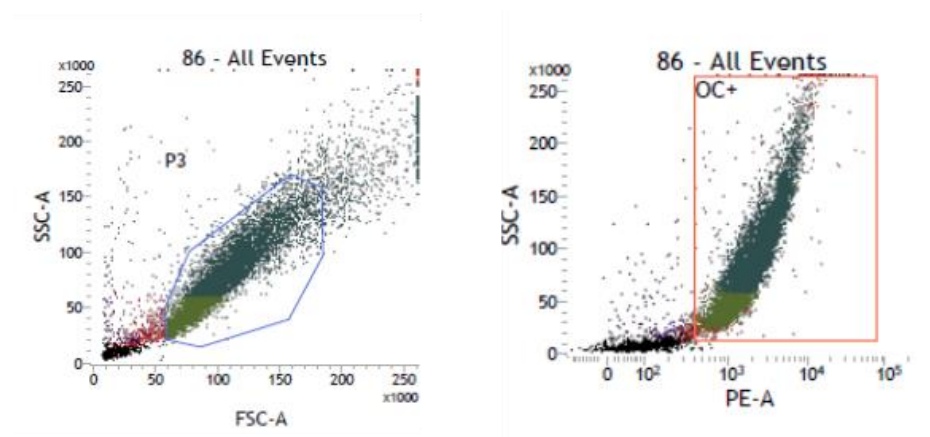
### **B) Comprobación de la pureza de los cultivos de osteoblastos primarios**

Con el objetivo de comprobar que los cultivos primarios eran efectivamente osteoblastos, realizamos un control por citometría de flujo para determinar si las células expresaban osteocalcina, un marcador de linaje osteoblástico (Figura 23). Como ya se ha explicado anteriormente, la osteocalcina es una proteína producida por los osteoblastos durante la formación ósea, que se incorpora, en parte, a la matriz ósea.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que mide el paso de las células presentes en un fluido mediante el uso de una serie de

detectores, estas células pueden ir marcadas con diferentes fluoróforos, de tal manera que los detectores son capaces de discriminar entre tipos celulares diferentes.

Para este procedimiento, se recogieron las células con Accutase (BD, San José, CA, EEUU), una mezcla enzimática que se usó como remplazo a la tripsina cuando se realizó citometría de flujo, en especial cuando se analizaron marcadores de superficie de las células. Para poder marcar con osteocalcina, dado que es una molécula que no se encuentra en superficie, en primer lugar se tuvieron que fijar las células con el tampón de fijación (*BD Cytofix, Fixation Buffer*, BD) y después hubo que permeabilizarlas con el tampón de permeabilización (*BD Phosflow Perm Buffer III*, BD). Una vez preparadas las muestras, se procedió al marcaje de las muestras con un anticuerpo conjugado con ficoeritrina (PE, *phycoeritrin; PE Mouse Anti-Human Osteocalcin*, BD).



**Figura 23.** Imágenes de citometría de flujo representativas de uno de los cultivos de osteoblastos primarios. Como se puede apreciar, entorno a un 85% de las células del cultivo marcan para osteocalcina. El cultivo está enriquecido por tanto en osteoblastos maduros que ya han comenzado la mineralización.

### 3.3.3.2 Médula ósea completa, bazo y células B aisladas de ratón

Al realizar experimentos en modelo murino, si el objetivo del mismo lo requería, se cultivaron células de la médula ósea total, así como linfocitos B aislados mediante inmunopurificación magnética (ver más adelante). La

médula ósea se cultivó en medio DMEM, y las células de bazo y los linfocitos B inmunopurificados en RPMI 1640 (Gibco) ambos suplementados con SBF (20%) y P/E (1%).

### **3.4 Estudios de expresión génica**

Para los estudios de expresión génica se utilizó siempre ARN de buena calidad, entendiéndose como tal, ARN que hubiera pasado el análisis de integridad, obteniendo un RIN superior a 8, tal como se ha explicado en el apartado 3.2.2.

#### **3.4.1 Retrotranscripción**

El primer paso en los ensayos de expresión génica es el de obtener el ADN complementario (ADNc), para lo cual se realizó una retrotranscripción (RT) a partir del ARN total de interés.

En general, en una reacción de 20 µl de volumen final, se usó un microgramo de ARN (aunque esta cantidad pudo variar en función de la naturaleza del experimento), obteniendo ADNc de cadena única con el kit de retrotranscripción *ThermoScript RT-PCR system* (Invitrogen) usando una mezcla de *Oligo-dT* y *Random Hexamers* (1:1). Este sistema se caracteriza por eliminar las estructuras secundarias del ARN, ya que la retrotranscripción se realiza a 50°C, gracias a la estabilidad de la retrotranscriptasa, que es capaz de mantenerse estable hasta los 70°C de temperatura. En consecuencia, la RT es mucho más eficiente.

Para cada experimento de RT, se preparó un blanco usando todos los reactivos excepto la muestra de ARN. Este blanco se usó como control negativo en los experimentos de PCR.

### 3.4.2 Ensayos de expresión génica por PCR a tiempo real

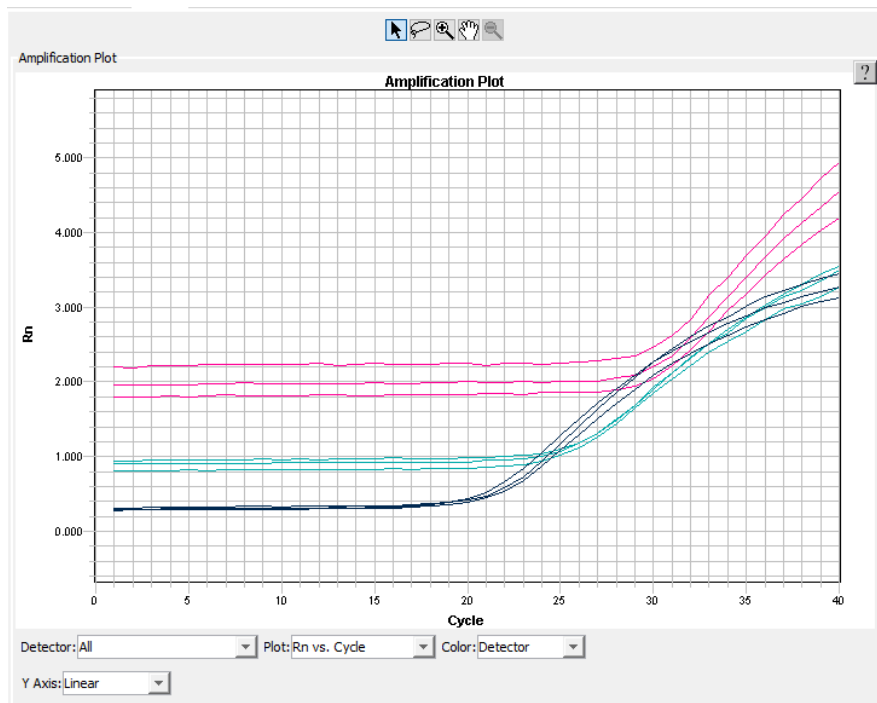
Una vez obtenido el ADNc se procedió a la estimación de la expresión de determinados genes en relación a la de genes de expresión constitutiva (genes *housekeeping*) mediante sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) específicas para cada gen.

La amplificación de cada muestra se llevó a cabo siempre por triplicado, en una reacción de 10  $\mu$ l de volumen final, con el 10% (v/v) de mezcla de retrotranscripción, 1X de tampón específico de expresión génica (*Gene expression master mix*, Applied Biosystems) y 1X de la sonda específica del gen a probar (TaqMan) de expresión génica.

Como se ha comentado anteriormente, mediante estos experimentos se determina la expresión relativa de nuestros genes de interés con respecto a genes endógenos que muestran una expresión constante en las distintas condiciones celulares (genes *housekeepings*). En todos los experimentos realizados en el presente trabajo hemos usado al menos dos genes *housekeeping*. Estos genes de expresión constante se determinan con el mismo procedimiento que para los genes problema y se usan como referencia en los cálculos de expresión, para normalizar los valores. En nuestro caso, los *housekeepings* utilizados habitualmente fueron *GAPDH* y  $\beta$ -*ACTINA*. Además, siempre dispusimos pocillos sin muestra como control negativo.

La determinación de la expresión relativa se llevó a cabo en un sistema de PCR a tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystems). Los datos se recogieron y analizaron con el *software* propio del sistema, SDS v2.4 (Figura 24). El ciclo de amplificación en que esta señal alcanza un nivel superior al límite de detección se conoce como Ct (*cycle threshold*, o ciclo umbral).

Una vez obtenidas las determinaciones se introdujeron en el *software* RQ Manager v1.2.1, que analiza las Ct, realizando una primera normalización de los datos, y estableciendo la fiabilidad de las mediciones tras lo cual se realizó la cuantificación relativa de la expresión génica, mediante el método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  (Pfaffl 2001).



**Figura 24.** Imagen obtenida mediante el *software* SDS 2.4 de los perfiles de expresión génica usando sondas TaqMan. En el ejemplo tenemos 3 ondas marcadas en colores distintos (negro *GAPDH*, azul,  $\beta$ -*ACTINA* y rosa, *CD40*, el gen problema). Para cada determinación, la muestra se mide por triplicado, lo que nos da tres réplicas técnicas. Como se puede observar, la señal de fluorescencia detectada es distinta para cada sonda en función de la expresión relativa para cada gen.

### 3.4.3 Ensayos de expresión génica por *microarrays*

A lo largo de esta Tesis se han determinado en varias ocasiones diferencias en la expresión génica a gran escala entre grupos mediante el uso de *microarrays*.

Para ensayos usando el modelo animal se emplearon dos tipos de *array*, *GeneChip® Mouse Genome Array 430 2.0* (Affymetrix, CA, EEUU), que contiene 45000 sondas que representan unos 34000 genes bien caracterizados, y en un ensayo posterior utilizamos el *array GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST* (Affymetrix), que contiene más de 698000 sondas que cubren más de 33000 transcritos.



En los ensayos en humanos, para caracterizar la expresión génica global en cultivos de osteoblastos primarios se usó el *array GeneChip® Human Gene ST Array* (Affymetrix), el cual cuenta con 1350000 sondas, que cubren más de 48000 transcritos.

El procedimiento en cada caso se llevó a cabo siguiendo instrucciones específicas del fabricante para cada tipo de *array*. Brevemente, el ARN se obtuvo usando Trizol (Invitrogen) y, en caso de ser necesario, éste fue purificado usando el *Kit PureLink Total RNA Purification System* (Invitrogen), tras lo cual se determinó su integridad y concentración según lo descrito en el apartado 3.2.2.

La síntesis de ADNc y ARNc, marcaje, hibridación y escaneo de las muestras se llevó a cabo como se describe en el Manual Técnico de Análisis de Expresión de GeneChip (Affymetrix). Se usaron 5.5 microgramos de ARNc fragmentado biotinilado para preparar el coctel de hibridación, y este preparado se hibridó durante 16h a 45°C con el chip (Affymetrix). Los *arrays* se lavaron, escanearon y analizaron, y finalmente se obtuvieron los archivos CEL desde los valores DAT, que son los datos crudos proporcionados por el sistema. Las diferencias globales entre muestras distintas (archivos CEL) se midieron por el análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminación lineal (LDA) y el agrupamiento jerárquico, usando el *software Partek Genomic Suite* (Agilent).

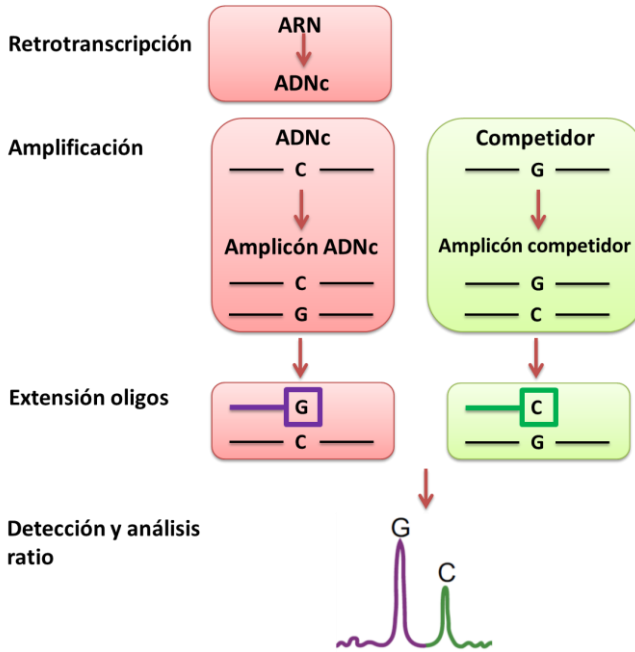
#### **3.4.4 Ensayos de expresión génica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Sequenom)**

Con el objetivo de validar la expresión génica obtenida mediante la tecnología de *microarrays*, se realizó o bien mediante PCRs a tiempo real, o bien mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Sequenom). Para la validación, se usaron las mismas muestras de ARN que en los *arrays* y se comprobaron en cada caso entre 15 y 20 genes de los obtenidos mediante el ensayo de *arrays*. Como se ha comentado anteriormente, también en la

validación se deben normalizar los resultados con respecto a genes de expresión constitutiva. En nuestro caso, en los ensayos de validación mediante Sequenom se utilizaron 4 genes *housekeepings*, *Gadph*, *Actb*, *Hprt1* y *Tubb5* para los ensayos en ratonas, y los genes *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT1* y *HMBS* en los ensayos con muestras humanas.

Brevemente, para determinar la expresión génica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se seleccionó una secuencia del gen de interés de entre 70 y 120 pb, con un único *mismatch* entre las dos hebras, de acuerdo con el análisis del *software*. Posteriormente se retrotranscribió un microgramo de ARN total a ADNc usando el sistema ThermoScript RT-PCR (Invitrogen), según lo descrito en el apartado 3.4.1. Después, el ADNc se diluyó 1/10 en agua DEPC y 1 µl de esta dilución, junto al competidor sintético con el *mismatch*, sirvieron de molde para la PCR competitiva (Figura 25).

Todos los cebadores de PCR y los competidores fueron diseñados usando el *software* de diseño de *arrays* multiplex QGE (Sequenom). La eliminación del exceso de dNTPs, la reacción de extensión de cebadores y la cuantificación de ARN se llevó a cabo según lo descrito en la guía de aplicación de Sequenom (<http://www.sequenom.com>).



**Figura 25.** Esquema de la técnica usada para determinar la expresión génica mediante espectrometría de masas.

### 3.5 Identificación de nuevos genes candidatos mediante estudios funcionales

#### 3.5.1 Ensayos traslaciones a partir de un modelo animal

El descubrimiento de nuevas rutas o genes implicados en la homeostasis ósea es un campo fundamental para poder aumentar las perspectivas de estudio e incrementar las posibles dianas terapéuticas. En este sentido el uso de modelos animales de pérdida ósea acelerada nos ofrece una herramienta excepcional para comprobar el efecto que ciertos genes tienen en la pérdida del hueso o en la fractura ósea particularmente, y para revelarnos nuevos genes candidatos para su asociación a fenotipos óseos.

### 3.5.1.1 Ovariectomía como modelo de pérdida ósea acelerada

En este trabajo se ha utilizado un modelo animal de pérdida ósea acelerada como es la ratona sometida a ovariectomía bilateral (OVX). Nuestro grupo había demostrado previamente que la OVX induce una pérdida ósea acelerada en ratonas esqueléticamente maduras. Efectivamente, cuatro semanas después de la OVX, las ratonas presentaron alrededor de un 35% menos de hueso trabecular, además de distintas alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias en la médula ósea (García-Pérez *et al.* 2006a; Cano *et al.* 2008).

Cuando se necesitó someter a las ratonas a este procedimiento, éste corrió a cargo de la veterinaria de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia, siempre siguiendo los estándares de bienestar animal establecidos en los reglamentos del centro y la normativa oficial. Todos los procedimientos con animales tuvieron que pasar la supervisión del Comité de Experimentación y Bienestar Animal, y ser notificados a la Concejalía de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua.

Una vez aprobados los procedimientos, se adquirieron hembras de ratón C57BL/6 esqueléticamente maduras o bien de Charles River Laboratories (Barcelona, España), o bien de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Como norma general, se usaron ratonas de 15 semanas de edad, si bien, en determinados experimentos pudo haber peculiaridades que hicieran que se usaran animales con una edad diferente. En cualquier caso, esto se encuentra especificado en cada estudio concreto. Una vez recibidas, se estabularon en un entorno controlado para aclimatarlas durante 7 días (cuarentena). Tras este periodo los animales ya se encontraban disponibles para la intervención.

La ovariectomía es una intervención que se realiza bajo anestesia general, realizándose una extirpación de los dos ovarios dorsalmente (ratonas OVX). Como control, algunas ratonas se intervienen falsamente, es decir, se les practica la intervención de la misma manera que al grupo OVX con la salvedad de que los ovarios no son extirpados, estos animales constituyen el grupo control o SHAM (falsamente operados). Todos los procedimientos

quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia general usando como pre-anestésico 0.1mg/kg de Butorphanol (Torbugesic, Fort Dodge Laboratories, Girona, España) o Buprenorfina (Buprex, Reckitt Benckiser Pharmaceuticals Limited, Berkshire, Reino Unido), Isoflurano al 5% (Veterinaria Esteve, Barcelona, España) para inducir la anestesia, y al 1.5% para mantener la anestesia durante el procedimiento. El sacrificio se llevó a cabo cuatro semanas después de la intervención.

✓ **Sacrificio y obtención de muestras**

En todos los experimentos con modelo murino el sacrificio de los animales se realizó por exsanguinación. El procedimiento se realizó aspirando sobre la vena cava ascendente, obteniendo alrededor de 500 µl de sangre total. A partir de la sangre extraída en el sacrificio se obtuvo el suero, para lo cual se dejó que ésta coagulara a temperatura ambiente y se centrifugaron los tubos a 900xg (Hitachi) quedando separadas en este punto la fase superior correspondiente al suero y la fase inferior correspondiente a porción celular y proteínas coaguladas. El suero se guardó a -80°C hasta su uso.

Una vez sacrificados los animales, para comprobar el éxito de la ovariectomía se extrajeron los úteros de todas las ratonas y se pesaron tras eliminar el exceso de grasa, la media del peso del útero entre ambos grupos mostró diferencias significativas, lo que indicó el éxito de la ovariectomía (García-Pérez *et al.* 2006a). La depleción estrogénica induce una atrofia uterina muy marcada, tal y como se observa en la Figura 26.



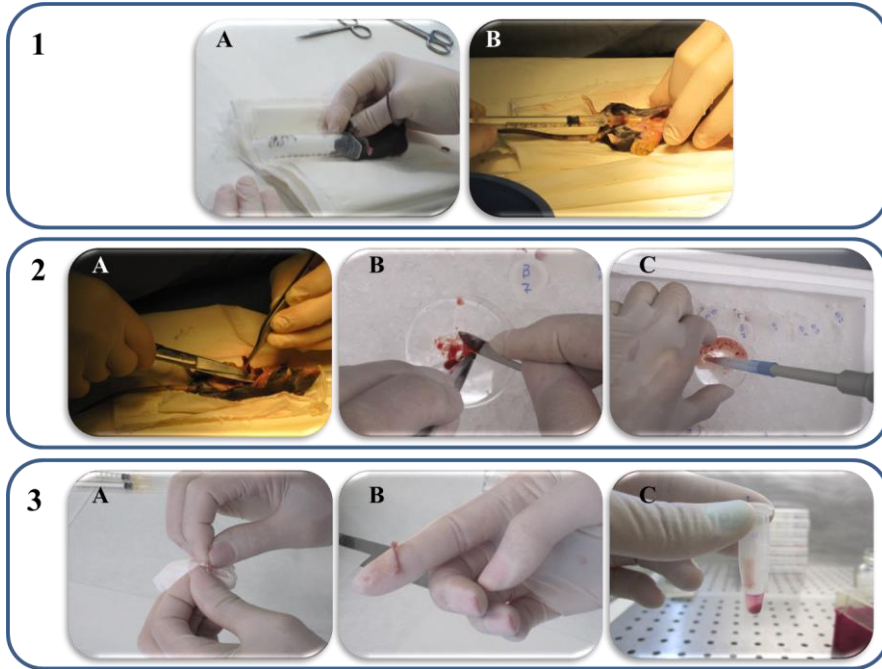
**Figura 26.** Fotografía de dos úteros de ratona. A la izquierda se muestra el de una ratona SHAM y a la derecha el de una ovariectomizada. La atrofia uterina del útero de la derecha demuestra el éxito de la ovariectomía.

En los experimentos con el modelo animal en los que fue necesaria la obtención de la médula ósea, se extrajeron los fémures de los animales sacrificados, se eliminó todo el tejido blando adyacente a los mismos y se cortaron las epífisis de los huesos, disponiéndolos en tubos estériles de 0.5 ml previamente perforados. Estos tubos se dispusieron dentro de tubos eppendorf de 1.5 ml con medio DMEM suplementado con SBF (10%) y P/E (1%).

Una vez dispuestos de esta manera, se centrifugaron los tubos durante un minuto a 10000xg, con el objetivo de extraer la médula ósea total de los fémures, que atravesó el tubo perforado y acabó recogiendo en el tubo de 1.5 ml (Cenci *et al.* 2000).

En el caso del bazo, tras la extracción, éste se conservó en PBS a 4°C hasta la obtención de las células. Para ello, se dispuso el bazo en una placa Petri con RPMI y con la ayuda de pinzas y de bisturís estériles, se disgregó el tejido obteniéndose una suspensión celular en medio RPMI. Posteriormente, se recogió esta suspensión celular, se centrifugó y diluyó apropiadamente en tubos estériles con RPMI.

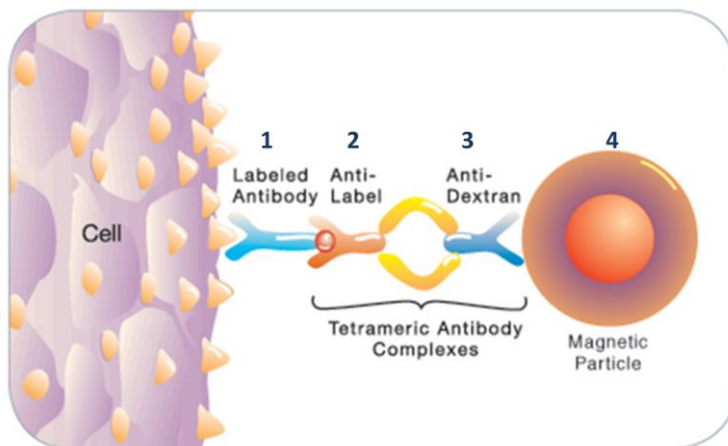
El procedimiento del sacrificio y de extracción de muestras se detalla en la Figura 27.



**Figura 27.** Procedimiento de extracción de muestras tras el sacrificio. **(1)** Sacrificio del animal. En el apartado **A** se observa la inhalación de isoflurano, que deja anestesiado al animal y en **B** se detalla el momento de la exsanguinación de la vena cava. **(2)** Extracción y procesado del bazo. **A.** Momento de la extirpación **B.** Disgregación del bazo con ayuda de bisturí quirúrgico. **C.** Recogida de las células disgregadas en RPMI. **(3)** Extracción y procesado de la médula ósea.

#### **A) Inmunopurificación magnética de células B a partir de médula ósea total**

La obtención de las células B de ratón a partir de la médula ósea total o de bazo, se llevó a cabo mediante inmunopurificación magnética usando el sistema EasySep (Stemcell, Vancouver, Canadá). Este sistema se basa en acoplar un complejo tetramérico a la célula diana con el fin de marcarla magnéticamente, y permitir que se quede retenida al introducir el tubo en un imán. El complejo actúa como se detalla en la Figura 28.



**Figura 28.** Representación esquemática del complejo tetramérico formado en el sistema EasySep. El anticuerpo marcado (en nuestro caso anti-CD19) marcado con PE (1) es reconocido por un anticuerpo anti-PE (2). A su vez, la partícula magnética está recubierta por dextrano (4), por lo que es reconocida por un anticuerpo anti-dextrano (3).

Se decidió realizar una selección positiva, utilizando en el complejo tetramérico el anticuerpo monoclonal anti-CD19, ya que ésta es una proteína de membrana específica del linaje de las células B, que se expresa a lo largo de todo el proceso de diferenciación, se considera un marcador panleucocitario B. El procedimiento se realizó tal como se detalla en las instrucciones del fabricante. Al introducir la muestra marcada en el imán, tan solo las células que habían incorporado el complejo magnético, y que por tanto presentaban CD19, quedaron retenidas en el imán (fracción positiva), mientras que las células no marcadas permanecieron solubles, pudiendo ser recogidas en un nuevo tubo (fracción negativa).

Este sistema no sólo tiene la ventaja de ser compatible con citometría de flujo, sino que además, las células seleccionadas salen ya marcadas con ficoeritrina (PE), un fluoróforo que permite visualizar las células inmediatamente tras su purificación. Con el fin de evaluar el éxito del procedimiento y la pureza que tenían los extractos de células B, analizamos una alícuota de cada una de las muestras en el Servicio de Citometría donde se



cuantificó, en cada caso, el porcentaje de células B presentes tanto en la fracción positiva como en la negativa de las muestras tanto de ratonas ovariectomizadas como de sus controles SHAM.

## **B) Inmunofenotipo celular mediante citometría**

Dado que se usó un anticuerpo marcado con PE en la etapa de inmunopurificación magnética (anti-CD19 PE), tras la obtención de las fracciones positivas y negativas, se procedió a la cuantificación del nivel de células CD19<sup>+</sup> en ambos casos por citometría de flujo (FacsVerse: BD, San Jose, CA, EEUU).

El fundamento de la técnica se basa en la utilización de luz láser, que permite el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas. Las células son impulsadas a través de un tubo capilar y cuando pasan a través del haz de luz láser, se recoge la luz transmitida y dispersada lo que permite inferir el tamaño y complejidad de las células. El parámetro que determina el tamaño se denomina *forward scatter* (FSC), mientras que el *side scatter* (SSC) nos muestra la complejidad celular de la población. En nuestro caso, consideramos mejor referir las determinaciones al SSC, dado que se trata de una población con gran número de células distintas, lo que dota al sistema de gran complejidad.

## **3.6 Diseño y ejecución de un estudio de asociación genética**

Los estudios de asociación de polimorfismos en genes candidatos a fenotipos óseos, tanto conocidos como nuevos, es el pilar central de este trabajo de Tesis. Aunque la estrategia para la elección de los genes candidatos varió en cada caso, los pasos seguidos en los distintos estudios de asociación se ajustan a lo que se describe a continuación.

### 3.6.1 Selección de sujetos, genes y polimorfismos

Los sujetos participantes en los estudios de asociación se seleccionaron de la cohorte DMO y se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión citados previamente (apartado 0).

En el presente trabajo, y como norma general, para la elección de los SNPs a estudiar se acudió a las bases de datos HapMap y dbSNP (NCBI; *National Center for Biotechnology Information*) eligiendo, en la medida de lo posible, SNPs con una frecuencia del alelo menor >5% (MAF, *Minor Allele Frequency*). En determinados estudios, sin embargo, la elección de los SNPs vino determinada por su asociación previa a fenotipos óseos.

En el apartado de Resultados se describe con más detalle cómo se seleccionaron los distintos genes para los estudios de asociación. En este apartado se detalla la elección de los distintos SNPs analizados en este trabajo de Tesis Doctoral y cuyas principales características se pueden consultar en las tablas de cada experimento individual.

#### ✓ Bloques haplotípicos

El genoma humano no se transmite al azar, sino que lo hace preferentemente en bloques de diferente tamaño dependiendo del cromosoma, de la región cromosómica e incluso de la población de la que se trate (Goldstein and Cavalleri 2005).

Dentro de estos bloques, denominados bloques haplotípicos, los distintos SNPs se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento, por lo que no es necesario genotipar todas las variantes para obtener resultados válidos. Para elegir los distintos SNPs en alguno de los estudios, analizamos los bloques haplotípicos de la región génica de interés, usando el *software* Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). Los *tag*-SNPs (SNPs diana) se seleccionaron usando los algoritmos disponibles en Haploview mediante la opción de “*agressive tagging*” usando como criterios una MAF >0.05 en la población HapMap-CEU y un  $r^2=0.8$  (Barrett *et al.* 2005).

✓ **Priorización de los SNPs**

Para la selección de SNPs se utilizó una herramienta web, FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/>), con el fin de determinar el “riesgo” potencial asociado a cada SNP. Esta herramienta asigna un valor de riesgo tras aplicar un algoritmo a cada SNP basado principalmente en la posición de la variante genética dentro del gen, si modifica secuencias dianas para factores de transcripción, si afecta a lugares de *splicing* o a activadores o inhibidores del *splicing*, etc. Esta herramienta se movió a otra dirección web durante la realización de esta Tesis (<http://genepipe.ncgm.sinica.edu.tw/>).

✓ **Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), modelos de herencia y estratificación**

Para comprobar la homogeneidad de la población y la calidad del genotipado, las frecuencias genotípicas para cada SNP se contrastaron frente a las proporciones esperadas del EHW usando el *software* SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>) (Solé *et al.* 2006).

Este *software* también se usó para establecer el modelo de herencia (co-dominante, dominante, sobredominante y recesivo) y en determinados estudios, para analizar la asociación de los distintos haplotipos con determinados fenotipos óseos (ver apartado 4.2 de Resultados).

Finalmente, un parámetro a tener en cuenta en estudios de asociación poblacionales es determinar si en nuestra población existen estratificaciones o subestructuras (Pritchard *et al.* 2000). Es decir, subgrupos poblacionales más o menos independientes que posean distintas frecuencias genotípicas o distinta relación entre el genotipo y el fenotipo de manera que pudieran provocar alteraciones en el EHW o incluso generar falsos positivos. Se había demostrado previamente que nuestra población no presenta estratificación o subestructuras con una probabilidad mayor al 0.996 usando el *software* Structure (Pineda *et al.* 2010).

### 3.6.1.1 Elección de SNPs en nuestros estudios

En este apartado se detallan las características de los SNPs elegidos para cada uno de los estudios del presente trabajo de Tesis.

Para todos los SNPs se tuvo en cuenta la MAF, así como el valor  $P$  del equilibrio de EHW. Como ya se ha visto, el valor MAF nos indica la frecuencia del alelo menor y por tanto es indicativo de las frecuencias genotípicas que podíamos esperar en nuestra población. Por otra parte, el valor del EHW, aunque se trate de un parámetro usado en estudios poblacionales y que indica si las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes a través de las generaciones, en la práctica es un indicador de calidad del genotipado.

#### A) Replicación de estudios de asociación.

Respecto al estudio de replicación de resultados de SNPs asociados a DMO hallados en otras cohortes (Hoppman *et al.* 2010; Agueda *et al.* 2011; Vidal *et al.* 2011) se seleccionaron los SNPs rs312009 del gen *LRP5* (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5*), el rs4876869 del gen *TNFRSF11B* (osteoprotegerina) y el rs12503796 del gen *FGFBP1* (*fibroblast growth factor binding protein*). En la Tabla 4 se muestran las localizaciones concretas de cada uno de los SNPs. En la sección de Resultados se justifica la elección de estos tres polimorfismos.

**Tabla 4.** Descripción de los polimorfismos del ensayo de replicación de la asociación de SNPs hallados en otras cohortes.

Cr	SNP	Gen	Posición (GRCh38.p7)	Localización	AM	Am	MAF	P-EHW
11	rs312009	<i>LRP5</i>	68309770	2.8 Kb <i>upstream</i>	C	T	0.15	0.089
8	rs4876869	<i>TNFRSF11B</i>	118929038	Intrón 2	A	G	0.40	0.160
4	rs12503796	<i>FGFBP1</i>	15938608	promotor	C	A	0.46	0.420

**Cr:** cromosoma; **AM:** Alelo mayor; **Am:** Alelo menor; **MAF** frecuencia del alelo minoritario; **P-EHW:** P-valor del equilibrio Hardy-Weinberg.

En otro de los estudios de replicación, en este caso de nuestros propios resultados previos (Pineda *et al.* 2008, 2011), se seleccionaron SNPs en los genes *CD40* (*TNF Receptor Superfamily Member 5*) y *CD40L* (*CD40 Ligand*). Para el gen *CD40*, el software Haploview detectó dos bloques haplotípicos; uno en el extremo 5' y otro en el extremo 3' del gen. Seleccionamos cuatro SNPs en el bloque de 5' (rs1800686, rs752118, rs1883832 y rs745307); tres SNPs en la región interbloque (rs4810485, rs11569317 y rs3746821) y dos SNPs en el bloque del extremo 3' (rs11569333 y rs3765459).

Para el gen *CD40L*, el análisis mostró dos bloques haplotípicos que cubrían aproximadamente desde la región 5' UTR hasta el intrón 2 (bloque 1) y desde ahí hasta la región 3'UTR (bloque 2). Seleccionamos cinco SNPs en el bloque 1 (rs3092952, rs3092949, rs3092946, rs1126535 y rs5930973) y un SNP en el segundo bloque (rs3092923). Los detalles sobre estos SNPs se pueden consultar en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Descripción de los polimorfismos del ensayo de replicación de la asociación de SNPs hallados en nuestra cohorte y ampliación del estudio de *CD40* y *CD40L*.

Cr	SNP	Gen	Posición (GRCh38.p7)	Localización	AM	Am	MAF	P-EHW
20	rs1800686	<i>CD40</i>	46117764	0.5 kb <i>upstream</i> '	G	A	0.23	0.55
20	rs752118	<i>CD40</i>	46118099	0.14 kb <i>upstream</i>	C	T	0.24	1.00
20	rs1883832	<i>CD40</i>	46118343	5'UTR	C	T	0.29	0.93
20	rs745307	<i>CD40</i>	46118447	Intrón 1	G	A	0.24	0.25
20	rs4810485	<i>CD40</i>	46119308	Intrón 1	G	T	0.29	0.55
20	rs11569317	<i>CD40</i>	46122211	Intrón 2	C	G	0.03	1.00
20	rs3746821	<i>CD40</i>	46126472	Intrón 5	G	T	0.11	0.86
20	rs11569333	<i>CD40</i>	46127250	Intrón 6	G	A	0.13	1.00
20	rs3765459	<i>CD40</i>	46128768	Intrón 8	G	A	0.22	0.30
X	rs3092952	<i>CD40L</i>	136644791	3.4 Kb <i>upstream</i>	A	G	0.18	0.72
X	rs3092949	<i>CD40L</i>	136645176	3 Kb <i>upstream</i>	G	A	0.37	0.33
X	rs3092946	<i>CD40L</i>	136647444	5'- próximo	T	A	0.09	0.83
X	rs1126535	<i>CD40L</i>	136648396	Exón 1 (Leu/Leu)	T	C	0.16	0.79
X	rs5930973	<i>CD40L</i>	136649989	Intrón 1	G	A	0.06	0.76
X	rs3092923	<i>CD40L</i>	136659026	Intrón 4	T	C	0.10	0.85

Cr: cromosoma; AM: Alelo mayor; Am: Alelo menor; MAF frecuencia del alelo minoritario; P-EHW: P-valor del equilibrio Hardy-Weinberg.

## **B) Identificación de nuevos polimorfismos asociados a DMO mediante estudios funcionales**

Como resultado de los estudios traslacionales llevados a cabo en este trabajo de Tesis, se identificaron numerosos genes candidatos para estudiar su asociación a fenotipos óseos. En este contexto, a la luz de resultados que se detallarán más adelante, se llevaron a cabo varios ensayos a partir, tanto del modelo animal como de osteoblastos humanos. La selección de los polimorfismos para cada estudio se detalla a continuación.

### **B.1) Ensayos a partir de un modelo animal**

#### **✓ Expresión génica diferencial en médula ósea total tras la OVX**

En cuanto a los estudios traslacionales, en el primero de ellos (Pineda *et al.* 2014) se eligieron SNPs de cuatro genes que habían mostrado una expresión diferencial en médula ósea del ratón OVX (ver apartado 4.2.1.1 para más detalles).

Para el gen *IL7R* (*interleukin 7 receptor*), el *software* Haploview detectó un bloque haplotípico de 33 Kb, del cual se seleccionaron tres SNPs: rs6897932 el rs11567705 y el rs2228141.

Para el gen *CD79A* (*B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain gene*), el *software* no fue capaz de mostrar un bloque haplotípico claro, probablemente debido al bajo número de SNPs caracterizados en la región con una adecuada heterocigosidad. Seleccionamos dos SNPs en esta región: rs3810153 y rs1428922.

Para el gen *GPX3* (*glutathione peroxidase 3*) el *software* detectó tres bloques haplotípicos de 2kb, 5kb y menos de 1kb. Seleccionamos tres SNPs que pertenecían a los primeros dos bloques: rs1946234, rs3792796 y rs8177447.

Finalmente, para el gen *IRAK3* (*Interleukin 1 receptor associated kinase 3*), el análisis mostró dos bloques haplotípicos de 51kb y 1kb. Seleccionamos 6 SNPs en el bloque mayor (rs1732887, rs1168771, rs1168760, rs2289134,

rs1152888, rs1623665 y un SNP en el más pequeño; rs1152916. Los datos sobre estos SNPs se pueden consultar en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Descripción de los polimorfismos del ensayo traslacional llevado a cabo a partir de la expresión diferencial de genes en médula ósea total tras la ovariectomía.

Cr	SNP	Gen	Posición (GRCh38,p7)	Localización	AM	Am	MAF	P-EHW
5	rs1946234	GPX3	151019649	5'-próximo	A	C	0.10	1.00
5	rs3792796	GPX3	151022929	Intrón 1	C	G	0.39	0.20
5	rs8177447	GPX3	151027895	Intrón 4	C	T	0.22	0.91
5	rs6897932	IL7R	35874473	Exón 6 ( <i>missense</i> )	C	T	0.24	0.35
5	rs11567705	IL7R	35861050	Intrón 2	C	G	0.24	0.41
5	rs2228141	IL7R	35871171	Exón 4 (sinónimo)	C	T	0.17	0.89
19	rs3810153	CD79A	41881402	3'-próximo	A	G	0.41	1.00
19	rs1428922	CD79A	41875710	5'-próximo	G	A	0.49	0.29
12	rs1732887	IRAK3	66187836	5'-próximo	T	C	0.29	0.41
12	rs1168771	IRAK3	66195056	Intrón 1	T	C	0.41	0.028
12	rs1168760	IRAK3	66202070	Intrón 1	A	T	0.06	0.72
12	rs2289134	IRAK3	66204907	Intrón 2	T	C	0.32	0.082
12	rs1152888	IRAK3	66211448	Exón 5	G	A	0.06	0.72
12	rs1623665	IRAK3	66224402	Intrón 6	G	T	0.38	0.025
12	rs1152916	IRAK3	66241524	Intrón 8	A	T	0.47	1.00

*Cr*: cromosoma; *AM*: Alelo mayor; *Am*: Alelo menor; *MAF* frecuencia del alelo minoritario; *P-EHW*: P-valor del equilibrio Hardy-Weinberg.

El análisis usando el software FastSNP mostró un riesgo de medio a alto para rs1152888 (*IRAK3*), ya que éste puede afectar directamente a sitios de *splicing*; un riesgo medio a rs1126535 (*CD40L*), dado que es un SNP sinónimo (Leu/Leu); y proporcionó un riesgo de bajo a medio para los SNPs rs6897932 y rs2228141 (*IL7R*), ya que podrían afectar a sitios reguladores del *splicing*. Para el resto de SNPs el *software* asignó un riesgo bajo, nulo o desconocido de estar afectando a la expresión génica.

El *software* Genepipe mostró un riesgo de medio a alto para el SNP rs1126535 del gen *CD40L* cuando se analizaron los SNPs del estudio de *CD40/CD40L*, dado que esta variante podía afectar a la regulación del *splicing*.

### ✓ Expresión génica diferencial en células B de médula ósea tras la OVX

El segundo estudio traslacional (Panach *et al.* 2017) tuvo como objetivo comparar la expresión génica entre células B de médula ósea obtenidas de ratonas ovariectomizadas y ratonas SHAM. En este estudio se analizó la asociación de 9 SNPs en 9 genes con fenotipos óseos (Tabla 7) Los genes seleccionados pertenecían a las rutas y procesos más significativamente alterados por la ovariectomía en las células B de médula ósea (ver apartado 4.2.1.2).

**Tabla 7.** Descripción de los polimorfismos del ensayo traslacional llevado a cabo a partir de la expresión diferencial de genes de células B de médula ósea tras la ovariectomía.

Cr	SNP	Gen	Posición (GRCh38.p7)	Localización	AM	Am	MAF	P-EHW
3	rs867234	<i>CD80</i>	119562789	3.1kb upstream	G	C	17.1	0.81
3	rs2681406	<i>CD86</i>	122063038	Intrón 1	T	C	19.6	0.10
6	rs1620996	<i>SOX4</i>	21602321	3.7 kb downstream	C	T	12.7	1.00
11	rs1946518	<i>IL18</i>	112164735	2kb upstream	G	T	43.5	0.28
11	rs7117858	<i>SOX6</i>	15672916	294kb en 5'	A	G	22.8	0.51
13	rs9550987	<i>TNFRSF19</i>	23593366	Exón 2 (Ser31Thr)	T	A	22.2	0.25
17	rs228769	<i>HDAC5</i>	44115817	Intrón 2	C	G	23.6	1.00
19	rs3817624	<i>TYROBP</i>	35907997	Intrón 1	C	T	9.3	0.55
20	rs17576	<i>MMP9</i>	46011586	Exón (Gln279Arg)	A	G	35.1	0.61

**Cr:** cromosoma; **AM:** Alelo mayor; **Am:** Alelo menor; **MAF** frecuencia del alelo minoritario; **P-EHW:** P-valor del equilibrio Hardy-Weinberg.

De los genes seleccionados, siete mostraron una expresión significativamente diferente (expresión aumentada: *HDAC5*, *SOX4*, *TNFRSF19*; y disminuida: *CD80*, *SOX6*, *MMP9*, y *TYROBP*), mientras que dos de ellos no mostraron cambio alguno (*CD86* e *IL18*). El gen *CD86* se escogió debido a su estrecha relación funcional con *CD80*, mientras que el gen *IL18* fue elegido porque se detectó una expresión diferencial del gen codificante para el receptor de la proteína accesoria de IL18 (*IL18RAP*). De los genes seleccionados, sólo 3 de ellos habían sido asociados previamente a fenotipos óseos en mujeres *HDAC5*, *SOX4* y *SOX6* (Liu *et al.* 2009;



Rivadeneira *et al.* 2009; Duncan *et al.* 2011; Estrada *et al.* 2012). En este caso, nuestro objetivo fue replicar los resultados previos obtenidos.

Los genes restantes se seleccionaron en base a los datos publicados. Así, CD80 y CD86 inhiben la diferenciación de osteoclastos induciendo la rutaIDO/triptófano (Bozec *et al.* 2014). IL-18 se regula por PTH y es requerida por su función anabólica (Raggatt *et al.* 2008). TNFRSF19 es una diana de RUNX2, contribuyendo a la regulación de la osteoblastogénesis (Wu *et al.* 2014). TYROBP (DAP-12) es esencial para una correcta osteoclastogénesis (Koga *et al.* 2004a). La deficiencia de MMP9 causa una reparación defectuosa de la fractura ósea (Colnot *et al.* 2009). Finalmente, se ha descrito una asociación de SNPs en el gen *MMP9* con DMO en una población japonesa, si bien es cierto, que se ha descrito únicamente en hombres (Yamada *et al.* 2004).

Para los genes *HDAC5* y *SOX6*, se seleccionaron los SNPs rs228769 y rs7117858 respectivamente, que ya habían sido descritos previamente (Rivadeneira *et al.* 2009). Los SNPs de los genes *IL-18* y *MMP9* (rs1946518 y rs17576, respectivamente) se seleccionaron porque se habían descrito como variantes funcional que afectaban a la expresión génica (Giedraitis *et al.* 2001; Blankenberg *et al.* 2003). Por su parte, escogimos el SNP rs9550987 del gen *TNFRSF19* porque genera un cambio *missense* (Ser31Thr) en la proteína.

Para seleccionar el resto de polimorfismos, se utilizó la base de datos dbSNP del NCBI y se seleccionaron SNPs que tenían una heterocigosidad adecuada y una MAF en población caucásica superior al 5%. La posible funcionalidad de los SNPs se determinó usando el *software* GenePipe (<http://genepipe.ncgm.sinica.edu.tw/>).

Cuando se analizaron los SNPs del estudio de células B, el *software* Genepipe mostró un riesgo medio para el SNP rs9550987 del gen *TNFRSF19* y un riesgo bajo para el SNP rs17576 del gen *MMP9*, dado que ambos SNPs se encuentran en regiones exónicas.

## B.2) Estudio a partir de modelo celular. Expresión génica diferencial en osteoblastos de pacientes con fractura ósea.

En el caso del estudio traslacional a partir de un modelo celular se seleccionaron 4 SNPs de 4 genes que resultaron diferencialmente expresados en el estudio de expresión génica (ver apartado 4.2.2). En la  $<5\%$  y todos cumplieron el EHW.

**Tabla 8** se pueden observar las frecuencias alélicas, genotípicas y el valor de  $P$  del EHW. Ninguno de los SNPs tuvo una MAF  $<5\%$  y todos cumplieron el EHW.

**Tabla 8.** Descripción de los polimorfismos del estudio de caracterización del perfil de expresión génica en la fractura osteoporótica.

Cr	SNP	Gen	Posición (GRCh38.p7)	Localización	AM	Am	MAF	$P$ -EHW
5	rs1366594	<i>MEF2C</i>	89080244	176kb upstream	T	G	0.39	0.68
3	rs87939	<i>CTNNB1</i>	41096353	103kb upstream	A	G	0.33	0.95
6	rs2745599	<i>FOXCI</i>	1613451	3'UTR	A	G	0.28	0.28
8	rs9314318	<i>EBF2</i>	26046872	203kb upstream	G	A	0.32	0.2

*Cr*: cromosoma; *AM*: Alelo mayor; *Am*: Alelo menor; *MAF* frecuencia del alelo minoritario; *P-EHW*:  $P$ -valor del equilibrio Hardy-Weinberg.

Los genes se seleccionaron en base a datos publicados en relación al metabolismo óseo. El gen *MEF2C* (*Myocyte-specific enhancer factor 2C*) fue elegido debido a que previamente había sido relacionado con DMO en mujeres postmenopáusicas (Velázquez-Cruz *et al.* 2014), con la formación de hueso por parte del osteocito (Kramer *et al.* 2012; Wein *et al.* 2015), y en estudios GWAS de asociación a DMO (Zheng *et al.* 2013).

Por su parte, *CTNNB1* es un gen que codifica para la  $\beta$ -catenina, molécula implicada en angiogénesis, vía Wnt, y adhesión celular entre otros procesos. Asimismo, también había sido asociado a DMO en estudios GWAS (Hsu and Kiel 2012).

*FOXC1* (*Forkhead Box C1*) es un gen relacionado con la diferenciación osteoblástica (Mirzayans *et al.* 2012) y con la ruta de regulación transcripcional de las células madre embrionarias (Omatsu *et al.* 2014).

Por último, *EBF2* (*Early B-Cell factor 2*) es un gen relacionado con las células B y por tanto con la Osteoimmunología (Qian *et al.* 2013), con la OPG (Patiño-García *et al.* 2009), y con la diferenciación de osteoclastos (Kieslinger *et al.* 2005).

### 3.6.2 Genotipado mediante sondas TaqMan

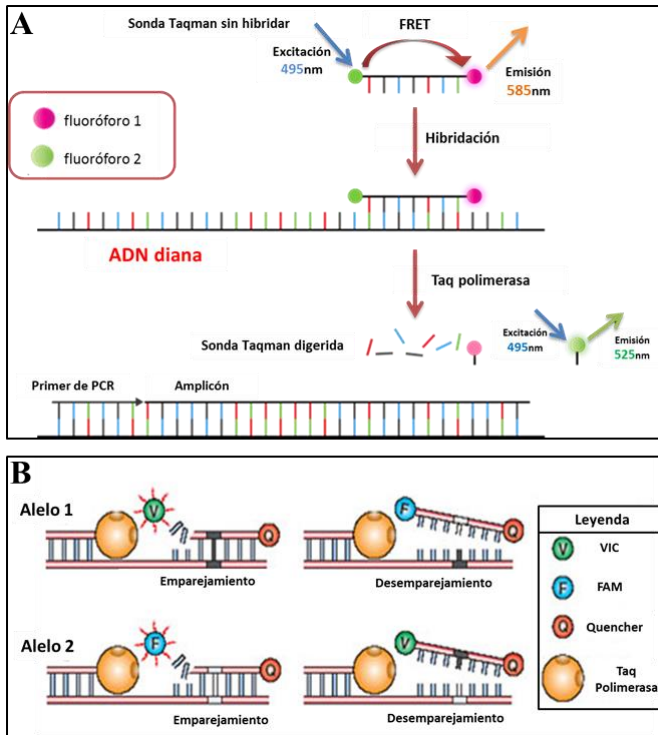
Como norma general, el genotipado de los SNPs estudiados en esta Tesis Doctoral se llevó a cabo usando ensayos de genotipado prediseñados TaqMan (Applied Biosystems). Estos ensayos incluyen sondas que permiten discriminar las muestras en función de los alelos que presentan, utilizando un sistema de PCR cuantitativa a tiempo real Fast 7900HT (Applied Biosystems), según las especificaciones del fabricante (García-Pérez *et al.* 2006b; Pineda *et al.* 2008).

El protocolo general consiste en amplificar 20 ng de ADN genómico de cada muestra dispuesto en placas de 96 o 384 pocillos en presencia de 1x de *Master Mix* para genotipado TaqMan (Applied Biosystems); que contiene la enzima polimerasa *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP* (Ultra Pure), dNTPs sin UTP, la referencia pasiva (ROX) y componentes optimizadores de la mezcla, y 1x de sonda específica de ensayo TaqMan. La tecnología basada en sondas TaqMan está fundamentada en el proceso de Transferencia de Energía entre Fluorocromos (FRET), que se basa en el hecho de que la sonda específica (oligonucleótido de ADN que incluye la región de estudio) está marcada con dos tipos de fluorocromos, un donador (*reporter*) y un receptor (*quencher*). Una vez la sonda ha hibridado, mientras permanezca intacta, la fluorescencia del *quencher*, que se encuentra situada en 3', inhibe la fluorescencia del *reporter*, situada en 5' (Figura 29.A).

Durante la fase de extensión del ADN, la Taq Polimerasa degrada la sonda y gracias a la actividad 5'-3' exonucleasa, libera al *reporter*, que al

verse libre del *quencher* es capaz de emitir fluorescencia. La señal fluorescente detectada en cada ciclo es proporcional, por tanto, a la cantidad de producto generado en ese ciclo. El ciclo de amplificación en que esta señal alcanza un nivel superior al límite de detección se conoce como Ct (*cycle threshold*, o ciclo umbral).

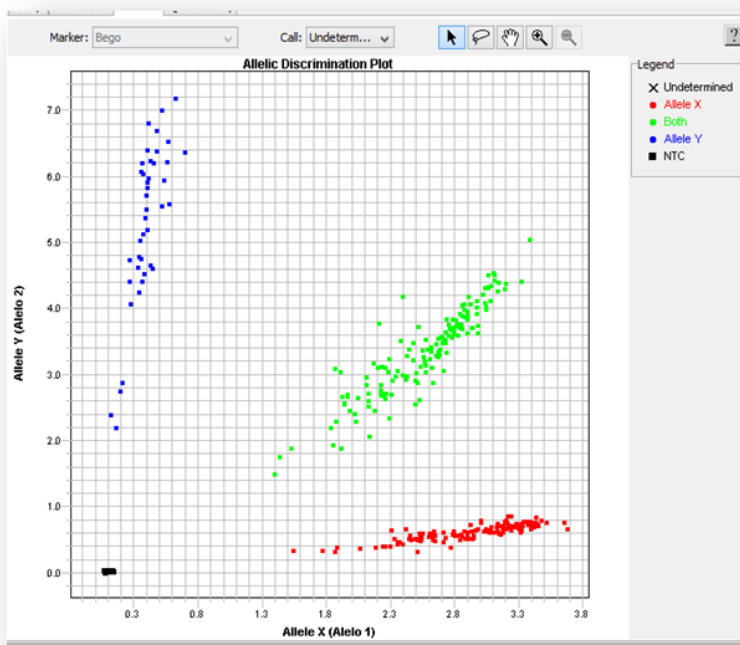
Este proceso que se acaba de describir es el fundamento de las sondas TaqMan en general. En el caso específico de ensayos para discriminación alélica el mecanismo es algo diferente en el sentido que se utilizan dos sondas distintas en la misma reacción (mismo pocillo), una específica para cada alelo y cada una marcada con un fluoróforo distinto, lo cual nos permite conocer los alelos que presenta cada muestra en un mismo pocillo (Figura 29. B).



**Figura 29.** Mecanismo de acción de las sondas TaqMan **A.** Sistema FRET general, en que se puede ver la transmisión de energía entre fluoróforos. **B.** Discriminación alélica mediante dos sondas diferentes. (Imagen modificada de la guía de genotipado de Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>)).

Una vez amplificadas las muestras, los resultados se analizaron con el *software* propio del termociclador, el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems), y cuyo resultado típico se muestra en la Figura 30.

Para estimar la reproducibilidad del ensayo, en cada experimento (placa de PCR) se incluyeron en torno al 8% de las muestras ya genotipadas previamente. La reproducibilidad fue siempre superior al 99%. Dependiendo del SNP, entre el 0.5-3.0% de los genotipos no resultaban claros, debido generalmente a una pobre amplificación, y las muestras tuvieron que ser genotipadas por segunda vez para confirmar el genotipo.



**Figura 30.** Imagen de la pantalla del *software* SDS 2.4 que muestra el resultado final de un ensayo de discriminación alélica mediante Sondas TaqMan. Como se puede observar, las fluorescencias detectadas son distintas según la presencia de uno u otro alelo. Específicamente en la imagen se muestran los dos genotipos homocigotos en azul y rojo y el genotipo heterocigoto en verde.

### **3.6.3 Genotipado mediante espectrometría de masas Madi-TOF (Plataforma Sequenom)**

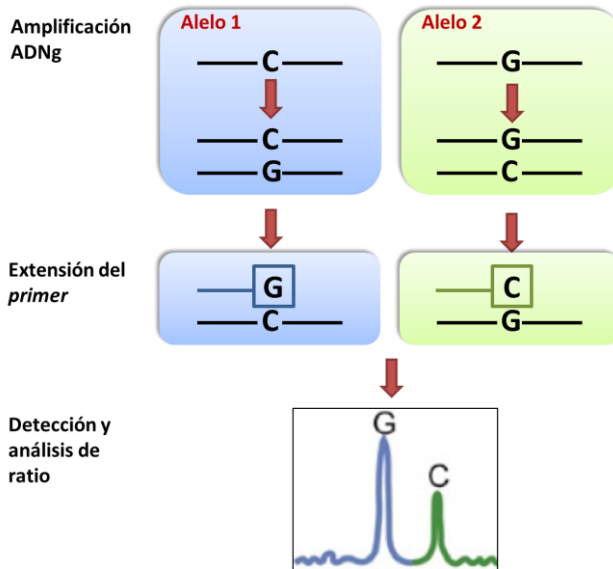
En este trabajo de Tesis Doctoral, cuando interesó genotipar gran cantidad de SNPs en toda la cohorte, también se recurrió al genotipado mediante otra aproximación técnica basada en la tecnología PCR a tiempo real competitiva y espectrometría de masas MALDI-TOF, facilidad disponible en el Servicio de Genotipado y Epigenética de nuestra institución (Plataforma Sequenom; CA, EEUU).

El ensayo iPLEX para genotipado de SNPs mediante la plataforma MALDI-TOF de Sequenom, es una herramienta válida para llevar a cabo estudios de genotipado y asociación a gran escala. Brevemente el método se basa en una extensión del cebador a partir de una única base tal como se observa en la Figura 31.

Para ello se diseñan para cada SNP 4 cebadores, dos de ellos se usan para llevar a cabo una amplificación inicial de la región (cebadores de amplificación), y los otros dos son específicos de para cada posible alelo (cebadores de extensión), siendo su extremo 3' inmediatamente adyacente al sitio polimórfico. Los cebadores de amplificación producen amplicones de un tamaño de entre 80-120pb. Tras la PCR convencional de amplificación, se añade la mezcla que contiene el cebador de extensión y se amplifica de nuevo la muestra.

Tras preparar la muestra ésta es hibridada en una placa SpectroChip (Sequenom) lo que permite una lectura automatizada y el análisis de datos por un espectrómetro de masas compacto TM MALDI-TOF.

El ensayo se basa en las pequeñas diferencias de masa que existen entre los productos gracias a la incorporación de terminadores con masa modificada, que permiten diferenciar entre el nucleótido presente en cada uno de los alelos. El análisis de datos se realiza en el módulo de *software* Typer.



**Figura 31.** Esquema del ensayo iPLEX de genotipado de Sequenom. En primer lugar, se amplifica el ADN genómico con ayuda de los cebadores de amplificación. En un segundo paso se procede a la extensión de los cebadores específicos para cada alelo, y se incorporan nucleótidos de masa conocida (terminadores), de tal manera que puede determinarse qué base ha incorporado en último lugar cada uno de los alelos.

### 3.7 Estudios de funcionalidad de las variantes genéticas

#### 3.7.1 Identificación de una expresión génica dependiente de alelo (EGDA)

Uno de los objetivos principales del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la caracterización funcional de las distintas variantes asociadas a fenotipos óseos. Para ello, siempre se ha intentado determinar la existencia de una expresión génica dependiente de alelo (EGDA). La idea que subyace en esta forma de proceder es que si la variante se asocia estadísticamente a un fenotipo óseo, es posible que sea debido a que ella misma es una variante funcional. En tal caso, los dos alelos de la variante deberían asociarse a tasas de expresión génica distintas ya sea porque los dos alelos interaccionen de forma distinta con elementos en *trans* (p.e. factores de transcripción) o bien

porque estén asociados a otros elementos en *cis* (p.e. la verdadera variante funcional o bien una metilación diferencial). Para ello se han llevado a cabo una serie de experimentos que se detallan a continuación.

### 3.7.1.1 Cuantificación de la EGDA mediante secuenciación

Para detectar una EGDA existen varias aproximaciones. Una de las que hemos manejado en el laboratorio consiste en determinar la expresión de cada alelo en un individuo heterocigoto para un determinado polimorfismo. En este caso, para poder realizar este tipo de análisis, es indispensable que la región donde se localiza el SNP en cuestión se transcriba a ARN maduro. Si esta expresión difiere entre ambos alelos, se dice que existe desequilibrio alélico (*allelic imbalance*) y consiste en que en un individuo heterocigoto el ratio de expresión entre ambos alelos en el ARN difiere del ratio 1:1 presente entre los alelos en el ADN genómico (Pastinen 2004).

El procedimiento consiste en obtener ADN genómico (ADNg) y ARN total de un tejido donde se exprese el gen portador del SNP estudiado. En nuestro caso usamos leucocitos de sangre periférica (PBLs, *Perypheral Blood Leukocytes*) de pacientes heterocigotas para dos SNPs de interés, el rs1883832 de *CD40* y el rs1126535 de *CD40L* (Tabla 5). Tras la obtención del ARN, se retrotranscribieron los ARNs a ADNc tal como se ha descrito previamente (apartado 3.4.1)

Dado que tanto ADN como ARN comparten solamente la región codificante, se diseñó un cebador directo que amplificaba tanto ADNg como ADNc y cebadores reversos específicos para cada uno de ellos. Para amplificar ambos SNPs se usaron los cebadores que figuran en la Tabla 9.

Los amplicones resultantes fueron secuenciados en el Servicio de Genotipado y Diagnóstico Genético de nuestra institución usando los mismos cebadores utilizados en la amplificación. Una vez obtenidas las secuencias, analizamos los picos de los electroferogramas resultantes usando el *software* PeakPicker (<http://genomequebec.mcgill.ca/EST-HapMap>), que permite cuantificar cada pico mediante una normalización del ratio de los



heterocigotos basándonos en la intensidad de los picos de expresión de bases cercanas que se establecen como controles (Ge *et al.* 2005).

**Tabla 9.** Cebadores y tamaños de los amplicones del ensayo de *allelic imbalance*.

Gen	SNP PC (GRCh38.p7)	Muestra	Cebador directo (5'-3')	Cebadores reversos (5'-3')	Tamaño
CD40L	rs1126535 (136, 648,396)	ADNg	ACCAAACCTTCTCCCCGATCT	CCATCATCCATCATTGGGTA	225 pb
		ADNc		CTTTAATCTCCTCACAGITCAGTAA	249 pb
CD40	rs1883832 (46, 118,343)	ADNg	GCAGGGGAGTCAGCAGAG	ACAAAAATCAGCCAGGAAGG	217 pb
		ADNc		GGCACAAAGAACAGCACTGA	189 pb

PC: posición cromosómica; ADNg: ADN genómico; pb: pares de bases

### 3.7.1.2 Cuantificación de la EGDA mediante qPCR

Otra de las formas en las que se buscó una posible EGDA fue mediante qPCR. En este caso, se extrajo ARN total de un tejido en el que el gen se expresa y se retrotranscribió como se ha descrito previamente. En este caso se seleccionaron mujeres homocigotas para los dos alelos y se comparó la expresión del gen entre ambos grupos de mujeres mediante qPCR usando sondas TaqMan, refiriéndola a aquella obtenida de los genes *housekeeping*.

### 3.7.1.3 Caracterización de la tasa de transcripción mediante ensayos de gen reportero

En base a este objetivo principal de caracterizar la EGDA, cuando se observaron diferencias en la expresión, con el fin de determinar si ésta era debida a una tasa de transcripción diferente dependiente de alelo se implementó una nueva metodología en el laboratorio para realizar ensayos de gen reportero utilizando plásmidos tipo pGL3 como vectores de transfección. El protocolo, independientemente de las variantes estudiadas, se realizó tal como se describe a continuación.

## A) Obtención de las construcciones

En primer lugar, se estudió en profundidad la secuencia adyacente a cada SNP, comprobando todos los polimorfismos presentes en la región y considerando las posibles opciones de diseño de cebadores, con el fin de obtener las secuencias amplificadas. Esto tenía como fin clonar secuencias idénticas excepto para el polimorfismo en cuestión, es decir, si existía algún otro polimorfismo cercano, que ambas construcciones tuviesen el mismo genotipo para ellos. En nuestro caso el rango de tamaños osciló entre 350-900 pb según la secuencia estudiada.

Los cebadores se diseñaron con la herramienta web Primer-3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) y después se les añadió secuencias diana específicas para dos de las enzimas de restricción que se encuentran en la región de clonado múltiple de los vectores pGL3 utilizados. En concreto se introdujeron las secuencias de *SacI* (5'-GAGCTC-3') en el cebador directo y la de *XhoI* (5'-CTCGAG-3) en la del reverso, así como una cola de 6 adeninas en cada uno de ellos para favorecer la posterior digestión por las enzimas de restricción.

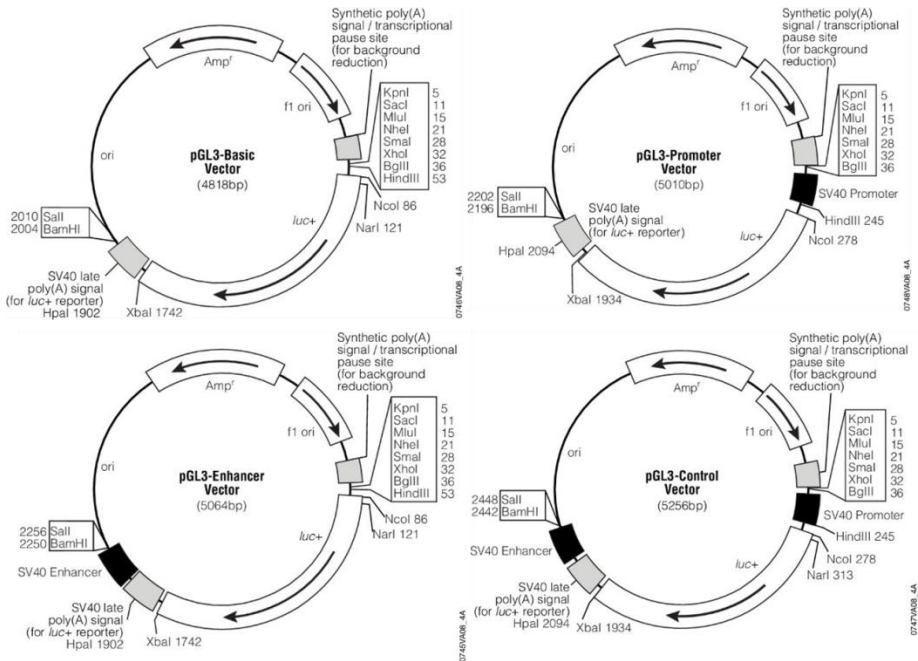
La amplificación de las regiones se llevó a cabo mediante PCR convencional, ajustando la  $T_m$  (Temperatura *melting*) según variara la secuencia de los cebadores..

Los vectores usados fueron los plásmidos comerciales pGL3 de Promega pGL3-Basic, pGL3-Promotor, pGL3-Enhancer y pGL3-Control (Figura 32). Todos ellos tienen en común el gen reportero de luciferasa, además del gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa, que dota al vector de la resistencia a ampicilina, y una región de clonado múltiple. Además, tanto pGL3-Promotor como pGL3-Control, presentan un promotor fuerte procedente del virus SV40; y pGL3-Enhancer y pGL3-Control disponen de un *enhancer* del mismo virus que intensifica la expresión.

En general se usaron pGL3-Basic y pGL3-Enhancer en aquellos casos que se clonó una secuencia promotora íntegra o con la mayor parte de secuencias consenso para el inicio de la transcripción, debido a que estos

vectores carecen de ellas. Consecuentemente, una vez transfectadas estas construcciones, debería producirse un aumento en la expresión del gen reportero.

Cuando el objetivo consistió en comprobar si la región contenía elementos reguladores que afectasen a la tasa de transcripción, usamos pGL3-Promoter. El vector pGL3-Control, por su parte, se utilizó siempre como control positivo de la tasa de transcripción, así como en aquellas secuencias en las que el elemento regulador resultó ser un inhibidor de la expresión génica.



**Figura 32.** Estructura de los vectores pGL3. Imagen tomada de Promega®.

Tras la amplificación de la región, tanto los amplicones como los vectores en los que ésta se iba a clonar se digirieron con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU), para las que se habían generado sitios de corte en los cebadores que amplificaron la región, y para las que existen sitios de restricción en la región de clonado múltiple de los vectores. La digestión tuvo lugar a 37°C durante 16 h en el

termociclador, seguido de una incubación durante 20 min a 65°C para la inactivación de las enzimas. Para comprobar la correcta digestión de los vectores, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez comprobada la digestión, los vectores fueron desfosforilados para evitar la recircularización usando la fosfatasa alcalina de Roche (Risch-Rotkreuz, Suiza), según las instrucciones del fabricante (30 min a 37°C y 2 min a 75°C).

Una vez desfosforilados los vectores, se realizó la ligación de las muestras con los mismos. Para ello el inserto se añadió en una relación 1:3 en masa. La cantidad de vector digerido fue 75 ng, y de inserto 225 ng, a los que se les añadió 5U de Ligasa T4 (Roche) en un volumen final de 30 µL.

La ligación se llevó a cabo en dos pasos, en primer lugar, se realizó una mezcla inicial con el vector, inserto y agua, y se incubó a 45°C durante 5 min con tal de evitar las posibles complementariedades entre los diferentes extremos de vector e inserto. A continuación, se añadió la ligasa y el tampón y se dejó 16 h a 16°C, seguida de una inactivación enzimática de 10 min a 65°C cuando finalizó la reacción de ligación.

Una vez obtenida la construcción, se procedió a la transformación de un cultivo de bacterias competentes con la ligación. Se usó la bacteria *Escherichia coli* competente, es decir con capacidad aumentada de permitir la entrada de ácidos nucleicos en su interior mediante alteraciones en su membrana y pared celular. La competencia se indujo mediante un método químico usando RbCl<sub>2</sub> (Hanahan 1983). Brevemente, a partir de un precultivo de *E. coli*, se preparó un cultivo y se dejó crecer hasta que la densidad óptica a 590 nm alcanzó el rango entre 0.38-0.45 unidades de densidad óptica, lo que indica que el crecimiento se encontraba en fase exponencial. A partir de este momento se favorece la entrada del ADN exógeno a través de las zonas de adhesión de la pared bacteriana, por lo que se mantuvo el cultivo en frío, con la finalidad de disminuir el movimiento browniano de los fosfolípidos de membrana, y además se compensaron las cargas negativas del ADN con un catión divalente, en nuestro caso el rubidio. Una vez tratadas, las bacterias

competentes se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La incorporación de nuestra molécula de ADN recombinante (o construcción) y de los plásmidos vacíos, que se usan como controles al interior de las bacterias se realizó por choque térmico. El método se basa en someter a la célula a un cambio de temperatura de forma brusca para que el ADN penetre a través de las zonas de adhesión hacia el interior por diferencia de gradiente.

En primer lugar, se mezcló la construcción en un vial de células competentes y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos para favorecer la homogeneización de la construcción alrededor de todas las células.

A continuación, se produjo un choque térmico a 42°C en un baño seco Grant QBD2 (Grant Instruments, Royston, Reino Unido) durante 45 segundos y se depositó de nuevo el vial en el hielo. Se añadió medio Luria Broth (LB) (Pronadisa, Condalab, Madrid, España) sin ampicilina (Sigma-Aldrich), y se cultivó durante 1 h a 37°C, lo que permitió que las bacterias crecieran y sintetizaran β-lactamasa, una proteína que afecta al anillo betalactámico, una estructura molecular que presentan algunos antibióticos como la ampicilina o penicilina. La rotura de esta estructura desactiva las propiedades antimicrobianas de la molécula. A continuación, se sembraron los cultivos transformados en placas con ampicilina, dejándolas crecer durante toda una noche. Al incorporar ampicilina en el medio de cultivo, solamente son capaces de crecer aquellas células que han incorporado una de las construcciones que confiere resistencia, lo que permite la selección de las colonias de interés.

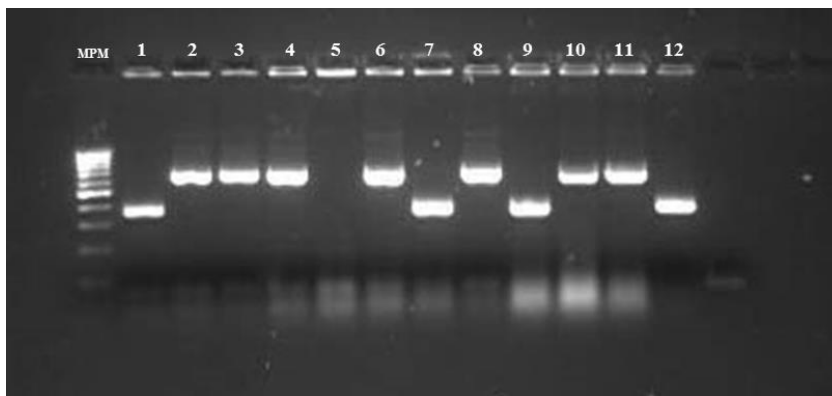
Al día siguiente se seleccionaron colonias aisladas para comprobar la presencia de la construcción con la que se transformó. Para ello, se picaron las colonias con una punta estéril, realizando en primer lugar una réplica en placa, y después depositando el resto de material en un tubo de PCR con la mezcla preparada para amplificar parte de la construcción usando cebadores internos al vector (Tabla 10).

**Tabla 10.** Secuencia de los cebadores específicos de los vectores pGL3. El tamaño de amplificado varía en función de si el vector en cuestión tiene o no el promotor de SV40, siendo de 169 pb para pGL3-Basic y pGL3-Enhancer y de 361 pb para pGL3-Promotor y pGL3-Control (tamaños de amplificación para el vector vacío).

		Secuencia
<b>RVprimer3</b>	Directo	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3'
<b>GLprimer2</b>	Reverso	5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA-3'

Para comprobar si el inserto está presente en las células que componen la colonia, o si, por el contrario, se trata de plásmido intacto se realizó una PCR con cebadores que amplifican la región de clonado múltiple del vector, de forma que el tamaño del amplificado era diferente si contenía o no el inserto en dicha región.

La comprobación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando como control negativo la amplificación del vector vacío. En la Figura 33 se observa la diferencia entre los tamaños de los amplificados según si han incorporado o no el inserto.



**Figura 33.** Comprobación de la incorporación del amplicón al vector pGL3 promotor mediante gel de agarosa al 1%. Como se observa, en las calles 1, 7, 9 y 12 existe la banda propia del vector intacto (361 pb), mientras que en el resto se produce un retraso de la banda debido a la incorporación de un inserto. MPM: Marcador peso molecular 100 pb.

Una vez comprobado el éxito de la ligación, se realizaron pre-cultivos en medio líquido LB sin ampicilina (100 ml) para las colonias positivas, y a

continuación se obtuvo plásmido recombinante en grandes cantidades mediante el kit Plasmid Plus Maxi kit (Quiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente el procedimiento se basa en una lisis alcalina que desnaturaliza el ADN y una neutralización que cambia bruscamente el pH favoreciendo la precipitación del ADN genómico, pero no del plasmídico, que consigue renaturalizar. Quedan por tanto en suspensión los ácidos nucleicos pequeños como el ARN y ADN plasmídico. En este paso, se usan columnillas de intercambio iónico que unen el ADN, purificándolo.

Una vez obtenido ADN plasmídico purificado se cuantificó en el espectrofotómetro para determinar la concentración y para asegurarnos de la presencia del inserto, de la orientación del mismo dentro del vector y de la no existencia de mutaciones, se enviaron las muestras a secuenciar en la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de nuestra institución.

## **B) Transfección y medida de la actividad luciferasa**

Para establecer el efecto funcional sobre la expresión del gen reportero, en este caso el gen de la luciferasa, las distintas construcciones se deben expresar en una célula eucariota en la que estén presentes los factores necesarios, tanto basales como reguladores. Para este proceso de transfección se usaron placas de cultivo de 6 ó 24 pocillos, según el diseño experimental, de cada uno de los tipos celulares que se pretendiera analizar. La transfección tuvo lugar cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia.

El procedimiento consiste en introducir ADN exógeno en el interior celular, para lo cual utilizamos lipofectamina LTX (Invitrogen Corporation, CA, EEUU). La lipofectamina es un reactivo que aumenta la eficiencia de incorporación de los ácidos nucleicos en células *in vitro* al formar complejos entre éstos y los lípidos catiónicos, que muestran afinidad por la membrana, permitiendo así la entrada del ADN exógeno al citosol.

La lipofectamina se preparó en el medio de cultivo correspondiente para cada tipo celular, preparado sin antibiótico ni suero para no interferir en la acción de la misma, según lo especificado por el fabricante. En la mezcla destinada a cada pocillo se incluyó la cantidad correspondiente de cada una de las construcciones, así como una cantidad fija del vector pRLSV40 de *Renilla reniformis* por cada pocillo. En general, se estableció que la proporción idónea era de 1:20 (pRLSV40: pGL3).

*Renilla reniformis* es un organismo formado por un conjunto de pólipos que tienen diferentes formas y funciones, entre ellas la bioluminiscencia. Por tanto, el uso del plásmido mencionado nos proporciona una medida de luminiscencia que permite establecer una ratio normalizadora. El procedimiento de determinación de la actividad luciferasa se realizó utilizando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, el ensayo consiste en transfectar los cultivos con la mezcla mencionada, dejar incubar esta reacción durante 5 horas, y sustituir el medio de transfección por medio completo (con suero y antibiótico). Las placas se incuban durante 48 h adicionales. Durante este periodo, las células tienen tiempo suficiente para repararse del daño causado por la transfección y expresar los plásmidos introducidos, tras lo cual las células son lisadas y ya puede determinarse la actividad luciferasa.

Para determinar el valor de luminiscencia se dispusieron 20  $\mu$ L de cada uno de los lisados en pocillos de una placa oscura y se añadieron 60  $\mu$ L del reactivo LARII del kit de Promega mencionado anteriormente. Se midió la luminiscencia procedente de los vectores pGL3 (luciferasa de la luciérnaga) y a continuación se añadió el reactivo *Stop and Glo* del mismo kit para medir la luminiscencia emitida por *Renilla reniformis*.

Estas determinaciones se realizaron en un luminómetro VICTORTM X3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) siguiendo las indicaciones del fabricante.



### 3.7.2 Cuantificación del grado de metilación de islas CpG en regiones promotoras

En el caso de detectar una EGDA que no era posible explicar por factores actuando en *trans* (factores de transcripción), se decidió analizar posibles factores que actúan en *cis*, como por ejemplo una metilación diferencial dependiente de alelo en la región promotora del gen.

En el caso del gen *CD40* se detectó un desequilibrio alélico mediante secuenciación que no era debido a que los distintos alelos unieran factores de transcripción de manera diferencial en la célula donde las construcciones fueron transfectadas. Por tanto, se decidió en primer lugar, detectar posibles islas CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción del gen *CD40* y tras esto, comparar el grado de metilación en mujeres con genotipo TT para el SNP rs1883832 (asociados a menor DMO) frente a mujeres homocigotas para el alelo C. Sin embargo, aquí se hizo patente el problema de la escasez de mujeres TT por lo que se decidió comparar mujeres de alta frente a baja DMO.

Con el objetivo de estudiar las diferencias en el grado de metilación de las islas CpG localizadas en torno al sitio de inicio de la transcripción del gen *CD40*, entre mujeres de baja y alta masa ósea (cohorte DMO), se establecieron dos grupos de mujeres según su masa ósea (ambos N=30). El valor de masa ósea se obtuvo como el valor promedio de la DMO del cuello femoral y de la columna lumbar, eligiendo las 30 mujeres con mayor masa ósea (DMO-CF:  $0.949 \pm 0.111$  g/cm<sup>2</sup>; DMO-CL:  $1.178 \pm 0.100$  g/cm<sup>2</sup>) y las 30 con menor masa ósea (DMO-CF:  $0.690 \pm 0.054$  g/cm<sup>2</sup>; DMO-CL:  $0.805 \pm 0.049$  g/cm<sup>2</sup>) para establecer los grupos. Todas las participantes en este estudio fueron mujeres menopáusicas sin tratamiento.

Para la identificación de las islas CpG, usamos la herramienta web *CpG Island Searcher* (<http://cpgislands.usc.edu/>) (Takai and Jones 2002), analizando más de 2000 pb alrededor del sitio de inicio de la transcripción del gen de *CD40* (Figura 34). Para llevar a cabo el análisis de cuantificación de la metilación se utilizó la plataforma MassARRAY EpiTYPER (Sequenom), un

sistema que combina la escisión de ácidos nucleicos específica de bases (MassCLEAVE) con el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Ehrich *et al.* 2005).

GCACTCCAGCCTGGGCAACAGAATGAGACTCTGTCAAAAAAACCCAAAAACCAAAACCAAAACAACAC  
 CCAAAAAACAAACGAAACAAAAACAAAAACAAAAGCACGTCCTTCAGAGTTCATGAACCCAGGAAAT  
 GTAGGCACAAGTGTGTGTGTTTCTGCAAAATGAGAGGGTCCCGAGTTTCCCTAACATACTTAAAGTGT  
 ATGATGCCACAAAAGGCTGGCCACTCTTTTTTTTTTTTGGAGATGGAGTTTTGCACTGTCGCCAGGCT  
 GAAGTGCAGTGTGTAATCATTCATGCAATCATGGCTCACTGCAACCTTGACTTCTTGAGCTCAAGCGATCCT  
 CCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGACTACAGGTGTTTGGCACCATGCCTGGCTAACTTAAAAATTTT  
 TTTATTTTGTAGAGATGGGGTCTTGCCATGTTGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCGGCCTCAAGCAATCT  
 CCTTTTTGGCCTTCCAAAGTGTAGATTACAGGCGTAAGCCACCGCGCCTGGCCCCACCTTTATTTTT  
 ATTTTTATTTATTTATTTATTTTTTTTTTTTTTTGAGACTGAGTCTTGCTCTGCCTTCGAGGCTGGAGTGCA  
 GTGGCACGATCTCGGCTCATTGCAATCTCTGCCTCTGCGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG  
 AGTAGCTGGGATTACAGGCGAACGCCACTACATCCGGTTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACCGGAGTTT  
 CACTATGTTGGCCAGGTTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGTCTGCCCGCCTCGGCCTCCTAAAGTG  
 CTGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGCCCGGGCCCCACTCTTAATAAATGCCTGTCTCCAGGTGCTGGGTG  
 GGAGTGGGATGGAATGGAATGAGGTGAGGACCGCATGGATGCATGGATGAATGGATGGGAAGTTGAGACCG  
ACGCGCCCACGAGGGAATTTCTTTTGAAGAGAGCGAAATCGTCTGAGTTGGGAAACTCTTCTTGAAC  
GCCTCCCCATACCCAGCTGTGGCCTTCCCGTTTTCTGCGTGGTGGTGGGGGAACTTCTCAGGCCT  
 CTCCGCAGTGGAGCCTCTTCGGTTCTGCCAGGATACCTAGAGGCAGCGGAGACCGGGGCAGGGAGGGGA  
 AAACCGTGAGGGTCCCTGTGGCAGGCCCCAGCACCCATGGGATCTCTCTCCGGTCGCAGGAAGCAGGCTA  
 GCTCCTAGCCCGCCTCGGCTTGGCCTTTGTGGGACCTGGGGGCAAGAAGAAGAGCTGTCTCTGGGACCA  
 TGCCCTCTCCGTACACAGCAAGATGCGTCCCTAAACTCCCGGGGGAATTAGACTTGTGGGAATGTTCTG  
 GGGAACTCCTGCGCGGTAATGCTGGGGGCTCCGCCCCCGATAGGTGGACCGCGGATTGGTCTTTGA  
 AGACCCCGCCCTTTCTGGGCGGGCCAAAGCTGGGGCAGGGGAGTCAGCAGAGGCCTCGCTCGGGCG  
CCAGTGGTCTGGCCGCGCTGGTCTCACCTCGCTATGTTCGTCTGCCTTGCAGTCGCTCCTCGGGGCTG  
 CTTGCTGACCGCTGTGAGTTGTTTTTGCCCGACCAGACCGGGAGTTGGGAGTGGGGAATGAGAAGGAAAG  
 GGAAGGAAGACTTCGGGGAAGAGGCCTTCTGGCTGATTTTTGTGGGGCAGGAGGGTGGGTGGGAGCTG  
 GGCAAGGTGCCCCCGCTCCTGGCTGAATGGGGTGGGCTGCCTCTCTCTCTCCCGGGCTGGGGTCCCGGG  
 AGCGGCCTACAGGGGCCGCTCAGGGAAGGCACTGGCTGCCCAAGCGTGCCTAGACCGGCCTGGACGGGTTT  
 AGGGAGCCTCAGAGGCTGGCCACACAGAGACTGGTAGGGGTTTCAGAGGGCGGAAAGTGAAGCGGACCAA  
 GGAAGGGGCGGGTCTGGCCCGTTTTCTGTCCCTTCTTATTGTGGACAGATGCCAGCCTCTGTAAGTAG  
 TTATCATCTCCTTGCCAGCTGGGGCTGCCTTCTTCCAGGGCATCTTGTGGGAACAAGAGATGGGTGCAGA  
 GGCCAGGTACTTTTTGTGAGAAGGCAAGGAGCTTTAACATCGCCTTCCACCCCGAACCG

**Figura 34.** Secuencia de 2160 pb en torno al sitio de inicio de la transcripción del gen CD40 (secuencia marcada en color rojo). Los sitios CG están marcados en color amarillo. El promotor se encuentra subrayado. Las secuencias verde y azul son las correspondientes a los cebadores que amplifican las dos regiones estudiadas.

Brevemente, el protocolo comienza con el tratamiento del ADNg (1µg; obtenido de PBLs) con bisulfito sódico durante 16 horas, usando el kit de metilación de ADN EZ-96 (Zymo Research, Irvine, CA, EEUU). A continuación, se realiza una amplificación por PCR con unos cebadores

especiales, los directos contienen una diana de 10 nucleótidos para ajustar las diferencias de  $T_m$ , y los reversos contienen el promotor de la polimerasa T7 para la transcripción *in vitro*.

De los posibles amplicones diseñados para el gen *CD40* por el *software* EpiDesigner (Sequenom), seleccionamos dos que cubrían el 40% de la isla CpG1 y la isla CpG2 completa. El protocolo de amplificación fue: 95°C durante 15 min (1 ciclo), y 95°C durante 20 s, 56°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s (45 ciclos). Los dNTPs que no se habían incorporado fueron defosforilados con fosfatasa alcalina de camarón (Sequenom).

Posteriormente, el promotor introducido se utiliza para realizar una transcripción *in vitro* a ARN usando 2  $\mu$ l de producto de PCR sobre la cadena reversa. El ARN obtenido se trata con RNasa A (específica de pirimidinas) y genera fragmentos que difieren en tamaño y en masa debido a su composición nucleotídica, generando un patrón de señales distintivo para el ADN metilado y no metilado que es analizado y cuantificado con el sistema MassARRAY. La abundancia de cada fragmento (nivel de señal/ruido en el espectro) es indicativa de la cantidad de metilación del ADN en la secuencia analizada.

La metilación fue analizada con el *software* EpiTyper (Sequenom) para generar resultados cuantitativos para cada sitio CpG. Los datos de metilación fueron generados como valores entre 0 y 1, indicando el porcentaje de metilación del molde original. Para cada muestra, el análisis de metilación se realizó por triplicado y los sitios CpG que mostraron más del 15% de diferencia en metilación entre las réplicas fueron excluidos.

### **3.7.3 Papel del sistema CD40/CD40L en la producción de osteoprotegerina (OPG)**

#### **3.7.3.1 Estudios en modelo animal**

Dado el papel crucial que tiene la OPG en la regulación de la homeostasis ósea (ver Introducción), el estudio de las fuentes de esta

citoquina y sobre todo, la posible implicación del sistema CD40/CD40L en su regulación, ha supuesto uno de los bloques centrales de este trabajo de Tesis.

Según lo descrito por Li y colaboradores (Li *et al.* 2007a), las células B representan la mayor fuente de producción de OPG en médula ósea. Dentro de este linaje, las células plasmáticas producen la mayor cantidad por célula, pero debido a la baja presencia de esta subpoblación en médula ósea (en torno al 1% del total), el papel de mayor productor total recae sobre las células B maduras. En este estudio se concluyó además que a pesar de que en bazo alrededor del 50% de las células son linfocitos B, la producción de OPG por célula es menor que en médula ósea o sangre periférica, si bien esta producción es incrementada mediante la estimulación con una proteína recombinante trimérica de CD40L, induciendo una expresión de OPG de hasta el doble que en las condiciones basales.

Para evaluar el efecto de la administración de un anticuerpo activador anti-CD40 de grado funcional (Miltenyi Biotec, Gladbach, Alemania), sobre la producción de OPG en células de médula ósea, bazo y, en especial, en células B CD19<sup>+</sup>, se diseñó un experimento usando como modelo ratonas de la cepa C57BL/6. El experimento constó de dos bloques que se detallan a continuación.

### **Estudio *in vivo***

El estudio *in vivo* se diseñó para comprobar el efecto de la administración intraperitoneal del anticuerpo activador de CD40 a dosis crecientes sobre el nivel de OPG sérica. El experimento se realizó en dos fases.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la inyección intraperitoneal del anticuerpo anti-CD40 a dosis creciente usando como control negativo suero salino (Fisiovet Solución, Braun, España).

Para ello se usaron 32 ratonas C57BL/6 de 10 semanas (Janvier), y tras 7 días de cuarentena en el animalario de la institución, se comenzó el

experimento. Se repartieron los animales aleatoriamente en 4 grupos experimentales, según lo dispuesto en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Número de individuos y tratamientos para cada grupo del estudio.

	<b>Dosis</b>	<b>N</b>
<b>Salino</b>	-	8
<b>mAb anti-CD40 - 0.5</b>	0.5 µg en 100 µl	8
<b>mAb anti-CD40 - 5</b>	5 µg en 100 µl	8
<b>mAb anti-CD40 - 50</b>	50 µg en 100 µl	8

Una vez identificados los individuos, se procedió a administrar a cada grupo las 6 dosis previstas de anticuerpo o control mediante una inyección intraperitoneal con una aguja de 27G. Estas dosis se administraron en días alternos durante 12 días (Figura 35).



**Figura 35.** Administración de los tratamientos mediante inyección intraperitoneal.

Tras la finalización del tratamiento se procedió al sacrificio por exsanguinación según lo explicado en el apartado 3.5.1.1. El suero se usó para la cuantificación de OPG por ELISA (OPG DuoSet, R&DSsystems). Todas las determinaciones de OPG en el modelo animal se llevaron a cabo con este ELISA directo como se describe en el apartado 3.2.3.

A la luz de los resultados del primer experimento, se decidió repetir el ensayo incluyendo la administración de un control isotópico de nuestro anticuerpo anti-CD40 para eliminar posibles efectos inespecíficos. Para ello, se adquirió una segunda tanda de ratonas (n=19) y se estableció el diseño experimental que se detalla en la Tabla 12. El procedimiento experimental fue idéntico al descrito para la primera tanda de ratonas.

**Tabla 12.** Número de individuos y tratamientos de cada grupo del estudio

	<b>Dosis</b>	<b>n</b>
<b>Salino</b>	-	<b>3</b>
<b>mAb anti-CD40 - 10</b>	10 µg en 100 µl	<b>4</b>
<b>mAb anti-CD40 - 50</b>	50 µg en 100 µl	<b>4</b>
<b>IgG 2k -10</b>	10 µg en 100 µl	<b>4</b>
<b>IgG 2k - 40</b>	40 µg en 100 µl	<b>4</b>

### **Estudio *in vitro***

Una vez sacrificados los animales de los estudios *in vivo*, se procedió a comprobar si los efectos de los tratamientos con respecto al nivel sérico de OPG se mantienen en cultivos celulares realizados a partir de médula ósea y bazo de estos animales. Estos estudios se han denominado *in vitro*. Las muestras de médula y bazo se obtuvieron según lo especificado en el apartado 3.5.1.1.

Además del experimento citado en el cual se comprobó si la producción de OPG era mantenida, en este apartado se determinó también la producción de OPG en cultivos de células B CD19<sup>+</sup> inmunopurificadas a partir de médula ósea total, según lo descrito anteriormente. Para ello, se sembraron células de médula ósea, bazo y linfocitos B CD19<sup>+</sup> de cada individuo de la primera tanda de ratonas (n=32) en placas de 24 pocillos, a razón de 400000 células por pocillo. A los 6 días se recogieron los sobrenadantes y se determinó la cantidad de OPG mediante ELISA (OPG DuoSet, R&DSystems), así como la cantidad total de proteína presente en cada pocillo usando el reactivo Bradford (Bradford 1976), a fin de comprobar que el número de células sembradas en todos los pocillos era igual.

### **3.7.3.2 Estudio del efecto de un anticuerpo activador de CD40 sobre la producción de OPG en varios modelos celulares**

#### **✓ Estudio en pre-osteoblastos**

Con el fin de comprobar si la estimulación de CD40 en el osteoblasto aumenta la producción de OPG, decidimos realizar un ensayo con la línea celular murina MC3T3-E1. Estas células son pre-osteoblásticas, por lo que se diferencian a osteoblastos en presencia de MOG (Medio osteoblastogénico).

Se probó el efecto de varios estímulos sobre la producción de OPG en el sobrenadante de estos cultivos. Concretamente, del anticuerpo anti-CD40 (Milteny), de su control isotípico IgG2k (BD), de la proteína trimérica CD40L recombinante (Peprotech, NJ, EEUU) y de la PTH (Peprotech). Todos estos experimentos se realizaron tanto en presencia como en ausencia de inductores de diferenciación osteoblástica (MOG), para comprobar si el efecto era dependiente del grado de diferenciación.

El diseño experimental se muestra en la Tabla 13 Diseño experimental del primer ensayo de estimulación de células MC3T3-E1. La cantidad de estímulo recibido en cada pocillo según su grupo experimental está indicada en cada caso. Se probaron todas las condiciones por triplicado, sembrándose las células en proliferación a razón de 50000 células/pocillo y las de confluencia a 150000 células/pocillo. El experimento comenzó cuando estos últimos alcanzaron el estado de confluencia. Tras 6 días de cultivo se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo para la determinación de OPG mediante ELISA (OPG DuoSet, R&D Systems) y se comprobó la cantidad de proteína presente en cada pocillo por el método Bradford.

**Tabla 13** Diseño experimental del primer ensayo de estimulación de células MC3T3-E1. La cantidad de estímulo recibido en cada pocillo según su grupo experimental está indicada en cada caso.

	<b>Estímulo</b>	<b>Cantidad estímulo</b>
<b>Control</b>	-	-
<b>CD40-0.5</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	0.5 µg/ml
<b>CD40-20</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	20 µg/ml
<b>CD40L-500</b>	Proteína trimérica CD40L (Peprotech)	500 ng/ml
<b>IgG-20</b>	Control isotípico (IgG2k) (BD)	20 µg/ml
<b>PTH-0.1</b>	Parathormona (PTH) (Peprotech)	0.1 nM
<b>PTH-2</b>	Parathormona (PTH) (Peprotech)	2 nM

En un segundo estudio, decidimos aumentar el número de variables y pocillos para cada condición, según lo dispuesto en la Tabla 14. Cada condición experimental se ensayó por cuadruplicado, disponiendo 400000 células por cada pocillo. Tras 6 días de cultivo se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo para la determinación de OPG mediante ELISA.

**Tabla 14.** Diseño experimental del ensayo de estimulación de células MC3T3-E1. Se indica el tratamiento y la cantidad de estímulo añadido en cada pocillo.

	<b>Estímulo</b>	<b>Cantidad estímulo/pocillo (ng)</b>
<b>Control</b>	-	-
<b>CD40-5</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	5
<b>CD40-10</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	10
<b>CD40-50</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	50
<b>CD40-100</b>	Anticuerpo anti-CD40 (Milteny)	100
<b>CD40L-50</b>	Proteína trimérica CD40L (Peprotech)	50
<b>CD40L-200</b>	Proteína trimérica CD40L (Peprotech)	200
<b>CD40L-500</b>	Proteína trimérica CD40L (Peprotech)	500
<b>IgG-5</b>	Control isotípico (IgG2k) (BD)	5
<b>IgG-50</b>	Control isotípico (IgG2k) (BD)	50
<b>IgG-100</b>	Control isotípico (IgG2k) (BD)	100

En esta ocasión los resultados no se normalizaron respecto a cantidad de proteína, ya que las células se lisaron con Trizol (Invitrogen) para obtener ARN, según lo descrito anteriormente, a fin de realizar un ensayo de expresión génica. En cualquier caso, se sembraron el mismo número de



células en cada pocillo, lo cual fue corroborado por la alta repetitividad entre las múltiples réplicas de cada condición experimental.

✓ **Estudio en células de médula ósea total, bazo y linfocitos B CD19<sup>+</sup>**

En un experimento piloto inicial se comprobó el efecto de la administración del anticuerpo activador de CD40 sobre células cultivadas a partir de MO total y Bazo de ratón.

Se dispusieron cultivos de 400000 células/pocillo a partir de la médula ósea y bazo de 4 ratonas de la cepa C57BL/6 sin tratamiento. Los pocillos se trataron según lo dispuesto en la Tabla 15. Se realizó un tratamiento con dosis 0.1, 1 y 10 µg/ml de mAb anti-CD40, y además se trató con fitohemaglutinina (PHA), un conocido mitógeno, a la dosis de 10 µg/ml. En el caso del cultivo de células de médula ósea, se añadió un pocillo extra en el que se realizó un co-cultivo con células de bazo previamente activadas con PHA (10 µg/ml) durante 24 horas.

**Tabla 15.** Tratamientos del ensayo de determinación del efecto *in vitro* de la estimulación de las células B y T de médula ósea y bazo vía CD40.

	Tratamiento	Concentración estímulo (µg/ml medio)
<b>MO TOTAL</b>	<b>RPMI</b>	-
	<b>CD40-0.1</b>	0.1
	<b>CD40-1</b>	1
	<b>CD40-10</b>	10
	<b>PHA</b>	10
	<b>LINF T</b>	Co-cultivo
<b>BAZO</b>	<b>RPMI</b>	-
	<b>CD40-0.1</b>	0.1
	<b>CD40-1</b>	1
	<b>CD40-10</b>	10
	<b>PHA</b>	10

A la luz de los resultados del experimento piloto, se decidió comprobar el efecto de la administración directa de mAb anti-CD40 sobre los cultivos de

células B CD19<sup>+</sup>, para lo cual, dispusimos de 8 ratonas no tratadas de la cepa C57BL/6.

Las ratonas se sacrificaron con 12 semanas de edad y se obtuvieron las células de médula ósea a partir de ambos fémures, inmunopurificando las células B CD19<sup>+</sup> a partir de la médula obtenida de uno de ellos tal como se describe en el apartado 3.5.1.1. El experimento no se realizó en bazo, ya que el resultado en el experimento piloto reveló que no había producción de OPG en ninguna de las condiciones.

Una vez obtenidas las células, se sembraron a razón de 400000 células/pocillo. Estos cultivos se trataron con el anticuerpo a dosis crecientes, así como con el anticuerpo anti-CD3 que es activador de las células T, según lo descrito en la Tabla 16. El sobrenadante se recogió en los días 3 y 6 y se determinó la cantidad de OPG y proteína total según lo descrito anteriormente.

**Tabla 16.** Tratamientos del ensayo de determinación del efecto *in vitro* de la estimulación de las células B y T de médula ósea vía CD40.

	Tratamiento	Concentración estímulo (µg/ml medio)
<b>MO TOTAL</b>	<b>DMEM</b>	-
	<b>CD40-0,1</b>	0.1
	<b>CD40-1</b>	1
	<b>CD40-10</b>	10
	<b>CD3+ CD40-1</b>	1 (de cada anticuerpo)
	<b>CD3</b>	1
<b>LINF B (MO)</b>	<b>RPMI</b>	-
	<b>CD40-1</b>	1

### 3.8 Expresión diferencial de micro-RNAs en la fractura ósea

Uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis Doctoral fue la caracterización fenotípica y la identificación de nuevos biomarcadores de riesgo de fractura osteoporótica. Por tanto, se decidió realizar un estudio del

perfil de microRNAs expresados en suero de pacientes que hubieran sufrido una fractura osteoporótica (grupo Fractura) comparándolo con el de controles osteoartríticas sometidas a cirugía de reemplazo de la cadera (grupo Control), con el fin de igualar al máximo las variables entre casos y controles. Este perfil de expresión de microRNAs se denominó “miRNAoma”.

El estudio se diseñó en dos fases. En primer lugar, se estudió el perfil de expresión diferencial de miRNAs séricos entre los grupos Fractura y Control en las mujeres de la Cohorte Fractura usando *pools*. Una vez establecido el perfil de expresión se validaron determinados miRNAs en muestras individuales.

### **3.8.1 Primera fase: Elaboración del perfil**

Para elaborar el perfil se seleccionaron dos pequeños grupos de mujeres, escogiendo sueros que no estuvieran hemolizados, ya que se ha descrito que la hemólisis afecta los niveles de ciertos miRNAs (Kirschner *et al.* 2011). La hemólisis se determinó mediante la cuantificación espectrofotométrica a 414 nm y se consideró la muestra hemolizada al superar el umbral de 0.2 OD.

#### **3.8.1.1 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y controles de calidad**

El análisis de la expresión diferencial de microRNAs séricos se llevó a cabo con el sistema miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). En primer lugar, realizamos una extracción de ARN total independiente para cada muestra usando miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Como control de calidad del proceso, y con el objetivo de determinar la eficiencia de la extracción, se añadieron tres ARNs sintéticos denominados *spike-ins* (UniSP2, UniSP4 y UNiSP5) a las concentraciones recomendadas por el fabricante.

Se descongeló el suero en hielo y después se centrifugó a 3000xg a 4°C. Se tomaron 200 µl del sobrenadante, se añadieron los *spike-ins* y se mezclaron

con 750 µl del reactivo de lisis QIAzol (Qiagen), que contenía 1.25 mg/ml de ARN del bacteriófago MS2 como *carrier* para favorecer la precipitación de los miRNAs. La extracción se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, a excepción del paso del lavado final (RPE buffer), que se realizó tres veces en lugar de una. El ARN total se eluyó en 50 µl de agua DEPC.

Para la síntesis de ADNc, se realizaron dos *pools* con idéntica cantidad de ARN de cada sujeto. El grupo Fractura contenía 8 muestras mientras que el grupo Control estaba formado por 5 ARNs. De cada *pool* de ARNs se realizaron tres síntesis de ADNc independientes (F1-F3 para el grupo Fractura y C1-C3 para el grupo Control) con el kit *Universal cDNA synthesis II* (Exiqon). Como un control de calidad adicional, durante la síntesis de ADNc, se añadieron otros dos *spike-ins* (UniSP6 y cel-miR-39) para detectar la presencia de inhibidores potenciales en el proceso de síntesis de ADNc o de la PCR a tiempo real.

### **3.8.1.2 Análisis de la expresión diferencial de miRNAs**

Una vez obtenidas las muestras de ADNc, se montaron en un panel de PCR de 384 pocillos para miRNAs de Suero/Plasma (V3.M: Exiqon). Estos paneles contienen cebadores específicos para la detección de los 179 miRNAs séricos más expresados en humanos (ANEXO III), además de contener cebadores para la detección de los *spike-ins* añadidos durante la extracción de ARN y la síntesis de ADNc que podría indicar variabilidad entre placas y la posible presencia de inhibidores en la síntesis de ADNc y/o en la PCR.

Cada placa de 384 pocillos contiene dos paneles completos de cebadores y 2 controles negativos. La PCR a tiempo real se llevó a cabo según instrucciones del fabricante en un sistema de PCR a tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystems). En cada placa de 384 pocillos, los ADNc de muestras de Fractura y Controles se amplificaron en paralelo.

Los valores de expresión se calcularon por el método de  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , determinándose los valores de media  $\pm$  DE, así como el *fold change* que

mostraba el valor de cambio entre el grupo control y el grupo de fractura ósea, para cada miRNA presente en el suero.

Un cambio de un *fold change* supondría un cambio del 100% del valor, es decir, un *fold change* puede entenderse como veces que cambia un determinado valor con respecto al valor inicial.

### 3.8.2 Segunda fase: Validación del perfil

Una vez se hubieron establecido las diferencias entre grupos, el objetivo fue validar los resultados usando un mayor número de muestras individuales. Durante la fase de validación se usaron ARNs de 12 controles y de 15 fracturas óseas, introduciendo un 40% de muestras hemolizadas en cada grupo, con el fin de comprobar si la hemólisis afectaba al nivel de los miRNAs diferencialmente expresados. Esto indudablemente es de interés para su posible aplicación clínica.

Para el análisis de la expresión de estos miRNAs, se llevaron a cabo PCRs a tiempo real siguiendo el mismo procedimiento detallado con anterioridad, pero en lugar de usar un panel donde estuvieran todos los miRNAs presentes en suero, se amplificaron las muestras con cebadores específicos de los miRNAs seleccionados (miRCURY LNA, Exiqon). Para normalizar la expresión de los miRNAs que estaban siendo validados, se usó el algoritmo GeNorm (*software* Exiqon). Esto hizo posible encontrar genes de referencia que no hubieran cambiado su expresión entre las dos condiciones experimentales, en nuestro caso dos candidatos buenos fueron miR-140-3p y miR-93-5p. Dado que este último también es un candidato a control endógeno en los *arrays* de Exiqon, se decidió usar miR-93-5p como *housekeeping*.

Como análisis de la capacidad diagnóstica de los miRNAs se elaboraron curvas ROC. Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) presentan la sensibilidad de una prueba diagnóstica que produce resultados continuos, en función de los falsos positivos determinándolos como el complementario de la especificidad, (1-especificidad), para distintos puntos de corte. La separación entre los grupos representa la capacidad discriminatoria de la prueba para

clasificar Controles y Fracturados como tales. Como medida de calidad diagnóstica calculamos el área bajo la curva (AUC, *Area Under Curve*). Esta área puede interpretarse como la probabilidad de que, ante un par de individuos, uno control y uno fracturado, la prueba los clasifique correctamente.

### 3.9 Análisis estadístico

Este trabajo de Tesis Doctoral está compuesto por un compendio de varios estudios que han sido realizados y analizados de manera individual, si bien existen unas consideraciones estadísticas comunes a todos los ensayos.

Con el objetivo de comprobar la distribución de las variables se realizó un análisis mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, que permitió comprobar si éstas se ajustaban a la distribución normal.

La prueba Chi-cuadrado se usó para determinar diferencias entre variables categóricas. Dado que la distribución Chi-cuadrado es continua, pero aplicamos sus resultados a datos discretos, se utilizó la corrección por continuidad de Yates.

La comparación de medias para los datos que presentaban una distribución normal se realizó utilizando modelos anidados de efectos fijos y efectos mezclados de ANOVA y ANCOVA. Si mediante estos test se obtuvo diferencias significativas, se aplicaron los test de corrección *post hoc* (p.h), para lo cual es necesario saber si las varianzas de las variables eran iguales o diferentes, lo que se calculó empleando el test de Levene. Si las varianzas eran iguales, se usó el test p.h. de Bonferroni, y si éstas eran desiguales, se empleó el test T3 de Dunnett.

Mediante el análisis de la covarianza (ANCOVA) y análisis de regresión lineal se examinaron las diferencias de parámetros cuantitativos (como DMOe o el parámetro Valor Z) tras ajustar por variables confusoras. Estas variables han podido cambiar en los diferentes estudios, pero en general se han considerado confusoras las variables IMC, edad, años desde la menopausia,

estatus menopáusico (pre-/peri-/postmenopausia), uso y tiempo de uso de TH, consumo de tabaco y tipo de densitómetro. De éstas, las variables cuantitativas se usaron como verdaderas covariables, mientras que aquellas dicotómicas se usaron como factores fijos en los modelos de regresión.

La regresión logística binaria es un análisis que predice el resultado de una variable categórica en función de otras variables independientes, como son la edad, el peso o el IMC. En este trabajo se utilizó el análisis de regresión logístico corregido para múltiples comparaciones mediante el método de corrección de Bonferroni. El riesgo relativo se calculó mediante el uso de la razón de probabilidades u *Odds ratio* (OR) (con intervalos de confianza del 95%) ajustado por las variables confusoras. Éste fue calculado por análisis de regresión logística para estimar el riesgo relativo de sufrir osteopenia (Valor T < -1) u osteoporosis (Valor T  $\leq$  -2.5), dependiendo del estudio.

Para comprobar la homogeneidad de la población de estudio y la calidad del genotipado para cada SNP, las frecuencias genotípicas se contrastaron frente a las proporciones asumidas en el equilibrio de Hardy-Weinberg usando el *software* SNPStats. Además, este *software* se usó rutinariamente para establecer el modelo de herencia (codominante, dominante, sobredominante y recesivo) y, en un estudio determinado, para llevar a cabo un estudio haplotípico con todos los SNPs de un gen respecto a DMO de cuello femoral y de columna lumbar. En algunos casos, para establecer qué variables entraron en los modelos de regresión logística se usó el modelo de entrada en bloque (*enter*) y en otras ocasiones el modelo de entrada condicional hacia atrás (*backward elimination*). En la primera de las formas, el *software* introduce todas las variables. En la segunda de las formas, el *software* las introduce todas y va eliminando las que no consiguen entrar en el modelo.

Otra forma de analizar la homogeneidad de la población es analizando si existen subestructuras, o lo que es lo mismo, si la población esta estratificada. La posible existencia de subestructuras de la población se examinó mediante el programa STRUCTURE v2.2 (Pritchard et al. 2000). Cada análisis se realizó sin una asignación previa de la población y se realizó al menos cinco veces obteniendo resultados similares usando 10.000 réplicas. La estimación

del número correcto de poblaciones se basó en la inspección visual de las respectivas probabilidades y de la distribución de las poblaciones entre los grupos deducidos.

El tamaño muestral y el poder estadístico se evaluaron mediante el programa QUANTO (<http://www.hydra.usc.edu/GxE/>) (Gauderman 2002).

El umbral de significación para corregir por comparaciones múltiples se llevó a cabo de diferentes formas. En ocasiones se aplicó la corrección de Bonferroni, esto es, dividir el nivel de significación normal 0.05 entre el número de repeticiones (SNPs, parámetros etc.) En las restantes ocasiones se usó la corrección *False Discovery Rate* (FDR) o test de falsos positivos de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Para calcular los valores  $Q$  en función de los valores  $P$  de los mismos conjuntos de datos se usó el *software* QVALUE del paquete estadístico R (versión 3.1.1; <http://www.r-project.org/>).

Para analizar la presencia de valores atípicos dentro de cada conjunto de datos se llevó a cabo el test de Tukey (estos valores se conocen comúnmente como *outliers*). A fin de normalizar la distribución en estos casos, se realizó una media *Winsorizada*, minimizando la influencia de los *outliers* mediante su reemplazo por el valor más próximo que sí se ajustaba a la normal (Barnett and Lewis 1994).

En el estudio de expresión génica de médula ósea total del modelo animal (Pineda *et al.* 2014), se utilizaron las herramientas estadísticas incluidas en *software* GEPAS 4 usando un test t para detectar diferencias en la expresión media entre los dos grupos (SHAM y OVX).

Los valores que aparecen en el texto, y en las tablas y figuras son medias  $\pm$  desviación estándar (DE) y frecuencias, a menos que se especifique lo contrario. Todos los análisis fueron de dos colas y se consideró significativo un valor de  $P < 0.05$ , excepto cuando se consideraron las comparaciones múltiples. Todos los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS de IBM para Windows (versión 22.0; Armonk, NY, EEUU).



# 4. RESULTADOS



La mayor parte de los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados en los artículos que figuran en el apartado “Publicaciones”. En la descripción de cada experimento se han integrado éstos con resultados pendientes de publicación.

#### **4.1. Replicación de estudios de asociación**

##### **4.1.1. Replicación de asociaciones halladas en otras cohortes**

Dada la importancia de la replicación de resultados en los estudios de asociación genética en general y en particular en los que se estudian fenotipos óseos, nos planteamos realizar un estudio de estas características con tres polimorfismos funcionales, cuya asociación había sido hallada en otras cohortes de mujeres. Se seleccionaron tres polimorfismos que se había descrito que afectaban a la expresión del gen, por lo que se consideran funcionales. El propósito del estudio fue comprobar si polimorfismos funcionales en estos tres genes, que ya habían sido previamente asociados con fenotipos óseos tales como baja DMO y/o fractura osteoporótica, pueden a su vez influir en la DMO en cuello femoral (CF) o columna lumbar (CL) en nuestra cohorte (Panach *et al.* 2014).

El estudio se llevó a cabo en la cohorte DMO, genotipándose 797 mujeres, de las cuales 721 tenían estudios densitométricos y cumplían los criterios de selección. De éstas, 619 eran mujeres postmenopáusicas, 67 perimenopáusicas y 35 se incluían en el grupo de premenopáusicas.

Se eligieron los SNPs rs312009 (C>T), un polimorfismo localizado en la región 5' del gen *LRP5* implicado en la unión del factor de transcripción RUNX2 (Agueda *et al.* 2011); rs4876869 (A>G), un SNP localizado en el intrón 2 del gen *TNFRSF11B*, que se describió que afectaba al nivel de OPG (Vidal *et al.* 2011); y rs12503796(C>A), un SNP localizado en el promotor del gen *FGFBP1*, que se asoció a una menor expresión del gen (Hoppman *et al.* 2010).

Las características antropométricas de las mujeres seleccionadas para el estudio se muestran en la Tabla 17. Como se puede observar, nuestra

población muestra parámetros óseos normales u osteopenia leve (para la CL) que son compatibles con la edad media de  $51.9 \pm 6.3$  años de nuestra cohorte.

**Tabla 17.** Características antropométricas y óseas de las 721 mujeres incluidas en el estudio con parámetros densitométricos.

	N	Valor
<b>Edad (años)a</b>	721	$51.9 \pm 6.3$
<b>Años desde la menopausia</b>	721	$5.3 \pm 5.8$
<b>Altura (cm)</b>	715	$157.7 \pm 6.2$
<b>Peso (kg)</b>	715	$65.7 \pm 10.7$
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	715	$26.5 \pm 4.2$
<b>DMOe-CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	680	$0.802 \pm 0.109$
<b>Valor T CF</b>	680	$-0.903 \pm 0.956$
<b>Valor Z CF</b>	680	$-0.105 \pm 0.932$
<b>DMOe-CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	719	$0.998 \pm 0.145$
<b>Valor T CL</b>	719	$-1.094 \pm 1.378$
<b>Valor Z CL</b>	719	$-0.244 \pm 1.167$

Los valores son la media $\pm$ DE. Los datos relativos a la edad se refieren a la fecha de la densitometría de la CL.

IMC, índice masa corporal; CF, cuello femoral, CL, columna lumbar, DMOe, densidad mineral ósea estandarizada.

En la Tabla 18 se muestran los datos de frecuencias genotípicas para cada polimorfismo en los genes *LRP5*, *TNFRSF11B* y *FGFBP1*, así como la asociación de cada uno de ellos con la DMOe de CF o CL mediante un análisis ANOVA simple, sin ajustar por covariables.

El *software* SNPStats asignó al SNP rs312009 en el gen *LRP5* un modelo de herencia dominante para el alelo T, debido a que mujeres con genotipo TT/TC para este SNP mostraban mejores parámetros óseos en la CL. El modelo asignado al SNP rs4876869 en el gen *TNFRSF11B* fue también dominante para el alelo G, ya que mujeres AG/GG mostraban una clara tendencia a presentar mejores parámetros óseos tanto en cadera como en columna.

Tal como se puede observar en la Tabla 18, el SNP rs312009 en el gen *LRP5* se asocia con DMOe de CL ( $P=0.005$ ). El SNP rs4876869 en el gen *TNFRSF11B* muestra una clara tendencia a la asociación con DMOe de CF

( $P=0.09$ ). Sin embargo, el SNP rs12503796 en el gen *FGFBPI* no mostró asociación a DMOe, por lo que no se continuó con su estudio.

**Tabla 18.** Análisis de la asociación entre genotipos y DMOe sin corregir por covariables. Los valores son la media $\pm$ DE. Entre paréntesis se muestra el mejor modelo de herencia obtenido con el *software* SNPStats.

Gen SNP (rs)	Genotipo	N (frecuencia)	DMOe-CF	DMOe-CL
<b><i>LRP5</i></b> rs312009	CC	588 (0.74)	0.801 $\pm$ 0.110	0.990 $\pm$ 0.143
	CT	186 (0.23)	0.805 $\pm$ 0.105	1.023 $\pm$ 0.143
	TT	23 (0.03)	0.809 $\pm$ 0.111	1.040 $\pm$ 0.155
	P valor		0.721	<b>0.005</b>
			(dominante)	(dominante)
<b><i>TNFRSF11B</i></b> rs4876869	AA	279 (0.35)	0.793 $\pm$ 0.111	0.993 $\pm$ 0.150
	AG	399 (0.50)	0.809 $\pm$ 0.109	1.000 $\pm$ 0.140
	GG	119 (0.15)	0.803 $\pm$ 0.109	1.001 $\pm$ 0.152
	P valor		0.090	0.504
			(dominante)	(dominante)
<b><i>FGFBPI</i></b> rs12503796	AA	239 (0.30)	0.795 $\pm$ 0.110	1.006 $\pm$ 0.141
	AC	383 (0.48)	0.806 $\pm$ 0.110	1.000 $\pm$ 0.146
	CC	175 (0.22)	0.801 $\pm$ 0.108	0.993 $\pm$ 0.144
	P valor		0.416	0.427
			(recesivo)	(dominante)

En la

se observan los datos de asociación al ajustar por las covariables edad, ADM, altura, peso, estado menopáusico y uso de TH. Así, la asociación entre el rs312009 de *LRP5* y la DMOe-CL se mantiene tras la corrección por comparaciones múltiples ( $P<0.0083$ ; 0.05/6 de acuerdo con Bonferroni). Sin embargo, la asociación entre el SNP rs4876869 en el gen *TNFRSF11B* y la DMOe no resultó significativa al corregir por comparaciones múltiples ( $P>0.0083$ ).

**Tabla 19.** Análisis multivariante entre los polimorfismos rs312009 (*LRP5*) y rs4876869 (*TNFRSF11B*) y fenotipos óseos, ajustando por las covariables edad, ADM, peso, altura, estado menopáusico y uso de TH, de acuerdo con el genotipo y un modelo de herencia dominante.

	<b>Fenotipos ajustados</b>
<b>rs312009</b>	<b>DMOe-CL</b>
<b>TT/TC</b>	1.024±0.010
<b>CC</b>	0.991±0.006
<b>P-valor</b>	<b>0.004</b>
<b>rs4876869</b>	<b>DMOe-CF</b>
<b>GG/GA</b>	0.806±0.005
<b>AA</b>	0.795±0.007
<b>P-valor</b>	0.178

Los valores son la media marginal estimada±EE. El valor P en la tabla es el que resulta del análisis multivariante tras la aplicación de las correcciones para comparaciones múltiples de Bonferroni.

Finalmente, la Tabla 20 muestra el riesgo estimado de osteoporosis en la CL y/o CF usando regresión logística, ajustada (o no) por covariables, de acuerdo con un modelo dominante de herencia para los SNPs rs312009 y rs4876869.

Respecto al SNP rs312009 del gen *LRP5*, las mujeres con genotipo CC mostraban un riesgo de sufrir osteoporosis en CL aumentado 2.42 veces con respecto a las mujeres de genotipo TT/TC ( $P=0.002$ ) para datos no ajustados y 2.82 veces para los datos ajustados por covariables ( $P=0.001$ ).

Las mujeres de genotipo AA para el SNP rs4876869 de *TNFRSF11B* mostraron una tendencia a tener un riesgo elevado de padecer osteoporosis tanto en cadera como en columna, aunque esta tendencia no llegó a ser significativa.

**Tabla 20.** Estimación del riesgo de osteoporosis para CF y CL, ajustado por la edad, ADM, altura, peso, estado menopáusico y uso de TH, de acuerdo con su genotipo y modelo de herencia dominante.

SNP (gen)	Fenotipo	Genotipos (N)	Casos (%) <sup>a</sup>	OR no ajustado (95% IC)	P-valor	OR ajustado (95%IC)	P-valor
<b>rs312009</b> ( <i>LRP5</i> )	OTP CL	TT/TC(186)	8.7	1		1	
		CC(533)	18.7	2.42 (1.38-4.22)	<b>0.002</b>	2.82 (1.53-5.22)	<b>0.001</b>
<b>rs4876869</b> ( <i>TNFRSF11B</i> )	OTP CF	GG/GA(431)	3.5	1		1	
		AA(249)	6.0	1.78 (0.85-3.71)	0.123	1.67 (0.77-3.62)	0.192
	OTP CL	GG/GA(431)	15.0	1		1	
		AA(249)	19.9	1.41 (0.94-2.11)	0.093	1.36 (0.88-2.10)	0.170

*OR*, odds ratio, *IC*, intervalo de confianza, *OTP*, osteoporosis, *CF*, cuello femoral, *CL*, columna lumbar.

<sup>a</sup> El porcentaje de mujeres con el genotipo dado que muestran osteoporosis en CF o CL (Valor  $T \leq 2.5$ )

#### 4.1.2. Ampliación de estudios propios

Nuestro grupo de investigación lleva años estudiando el papel del sistema CD40/CD40L en la osteoporosis, por lo que los estudios de asociación de polimorfismos en estos genes a DMO supone un bloque fundamental de esta Tesis Doctoral.

El polimorfismo C>T SNP (rs1883832) del gen *CD40* ha sido ampliamente estudiado en los últimos años en nuestro laboratorio, y hemos demostrado que mujeres con genotipo TT para el mismo, presentan menor DMOe en CF y CL, así como un riesgo aumentado de osteoporosis y osteopenia respecto a las mujeres con genotipo CC/CT (Pineda *et al.* 2008). Este estudio se amplió a un mayor número de SNPs localizados en el ligando de *CD40* (*CD40L*) con el fin de caracterizar mejor las asociaciones a lo largo de ambos genes cuyas proteínas codificadas interaccionan *in vivo*. En este estudio se concluyó que el polimorfismo rs1126535 de *CD40L* estaba asociado a DMOe de CL, siendo el genotipo TT el que se encontraba asociado a peores parámetros óseos en CL. Además, se encontró una interacción

genética entre los polimorfismos de ambos genes, de manera que las mujeres de genotipo TT para ambos polimorfismos (rs1883832 de *CD40* y rs1126535 de *CD40L*) mostraron peores valores Z, tanto para CF como para CL (Pineda *et al.* 2010).

Teniendo en cuenta los resultados previos sobre la relación del sistema *CD40/CD40L* con la DMO, se planteó como uno de los objetivos principales de esta Tesis esclarecer el papel de dicho sistema en el desarrollo de los diferentes fenotipos óseos (Panach *et al.* 2016). Para ello se decidió hacer por una parte un estudio de asociación genética y por otra, se trató de comprobar la funcionalidad de los SNPs asociados a DMO, así como la caracterización del papel del par *CD40/CD40L* en la producción de osteoprotegerina y su papel en la osteoporosis.

Con respecto al estudio de asociación genética a fenotipos óseos, se llevó a cabo un estudio de asociación completo (*gene wide*) a lo largo de los dos genes, con el fin de cubrir todos los bloques haplotípicos de ambos genes. El análisis de los bloques haplotípicos se realizó tal como se detalla en el apartado 3.6.1.1.

En este estudio se genotiparon 779 mujeres, de las cuales había 685 posmenopáusicas, 65 perimenopáusicas y 29 premenopáusicas. La Tabla 21 muestra las características de las mujeres estudiadas.

En las Figura 36 y Figura 37 se muestra las estructuras haplotípicas y los valores *P* de la asociación de los SNPs de *CD40* y *CD40L*, respectivamente, a los valores Z de DMOe tanto en CF como en CL, de acuerdo con un modelo de herencia recesivo para *CD40* y dominante para *CD40L*, estimado como el mejor modelo de herencia en cada caso con el *software* SNPStats (ANEXO IV).

Aunque dos SNPs del gen *CD40* (rs1883832 y rs4810485) mostraron *P*-valores <0.05 para DMOe de CF y CL (valores Z), ninguno conservó esta significación estadística tras ajustar por múltiples comparaciones (*P*<0.005) (Figura 36). Respecto al gen *CD40L* (Figura 37), tres SNPs tuvieron valores *P*

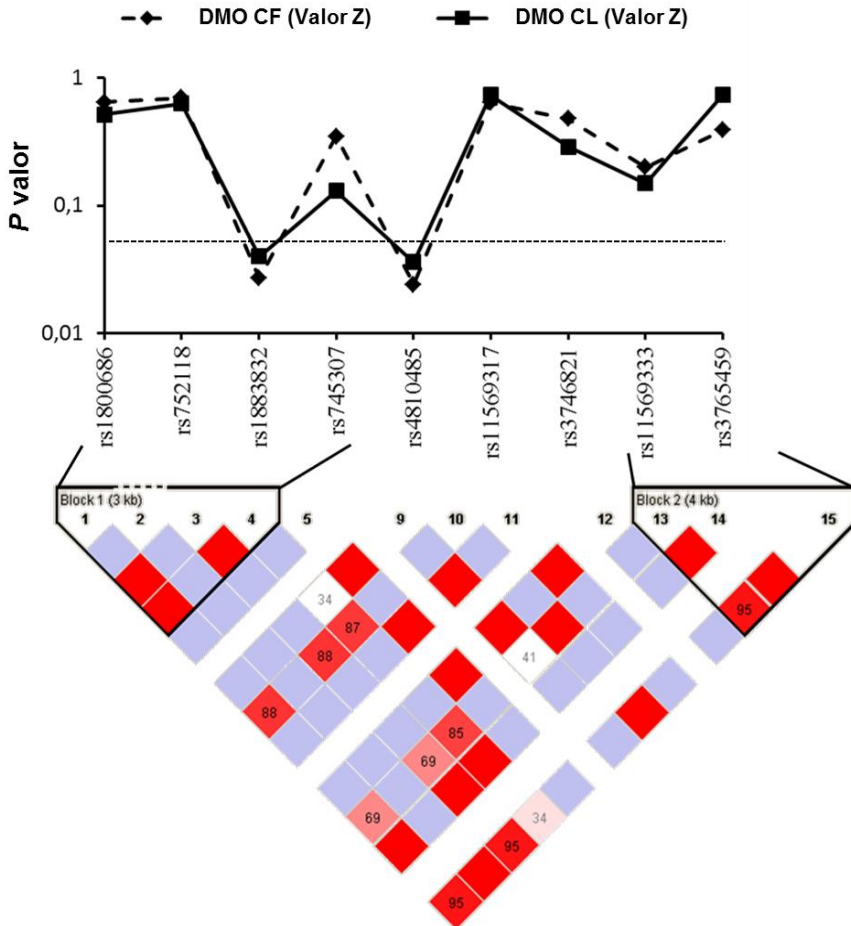


significativos ( $P < 0.05$ ), y uno de ellos permaneció significativamente asociado a DMOe de CL (valor Z) incluso tras aplicar un test para múltiples comparaciones (rs1126535;  $P = 0.0017$ ).

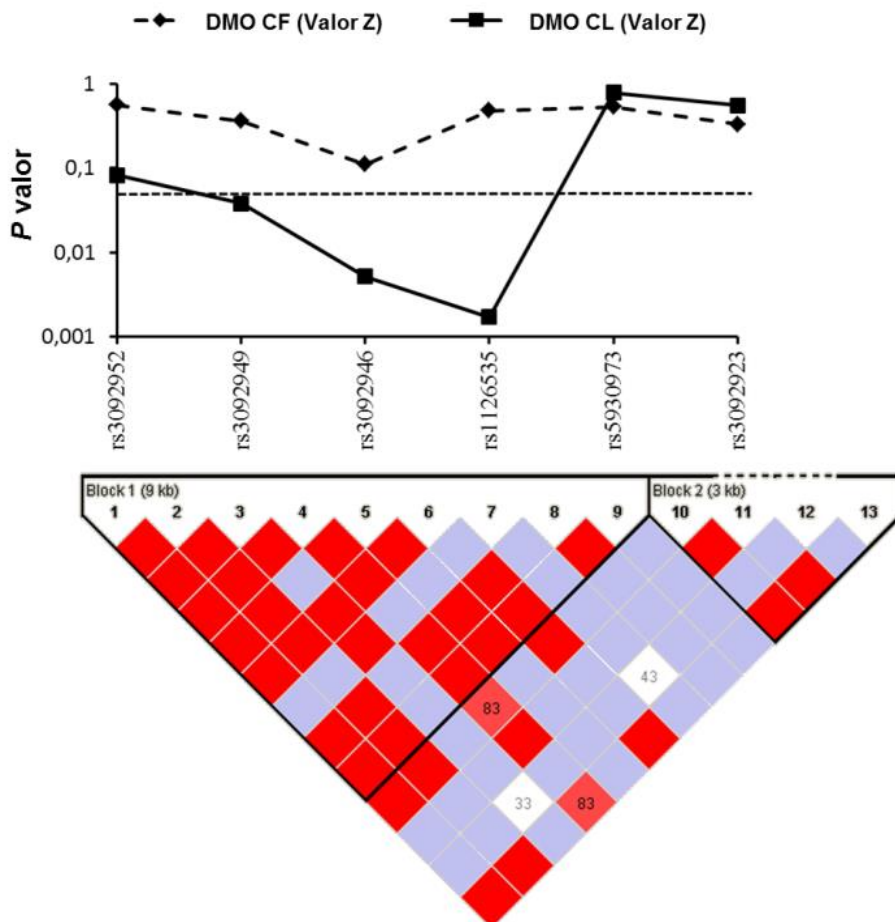
**Tabla 21.** Características antropométricas y óseas de la cohorte de mujeres españolas estudiadas (media $\pm$ DE o porcentajes).

	Número	Valor
<b>Edad (años)</b>	779	52.7 $\pm$ 6.4
<b>Años desde menopausia (ADM)</b>	779	6.2 $\pm$ 5.9
<b>Peso (kg)</b>	779	66.1 $\pm$ 11.0
<b>Altura (cm)</b>	779	157.7 $\pm$ 6.3
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	779	26.6 $\pm$ 4.3
<b>Estado posmenopáusico (%)</b>	685	88.0
<b>Menopausia Quirúrgica (%)</b>	206	26.4
<b>Usuarías TH (%)</b>	218	28.0
<b>OPG(pg/ml)</b>	510	101.7 $\pm$ 37.1
<b>DMOe-CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	748	0.808 $\pm$ 0.121
<b>Valor T CF</b>	748	-0.856 $\pm$ 1.05
<b>Valor Z CF</b>	748	-0.06 $\pm$ 0.99
<b>DMOe-CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	752	1.008 $\pm$ 0.154
<b>Valor T CL</b>	752	-1.03 $\pm$ 1.42
<b>Valor Z CL</b>	752	-0.17 $\pm$ 1.26

*IMC, índice masa corporal; TH terapia hormonal; OPG, osteoprotegerina; DMOe densidad mineral ósea estandarizada; CF, cuello femoral; CL, columna lumbar.*



**Figura 36.** Asociación ( $P$ -valores) de los polimorfismos del gen *CD40* a DMOe de CF y CL (Valores Z) en nuestra cohorte bajo un modelo de herencia recesivo. La línea discontinua representa el umbral de significación estadística no ajustado ( $P=0.05$ ). En la parte inferior de la imagen se muestra la estructura haplotípica y la localización de cada SNP en cada bloque haplotípico.



**Figura 37.** Asociación ( $P$ -valores) de los polimorfismos del gen *CD40L* con DMOe de CF y CL (Valores Z) en nuestra cohorte, bajo un modelo de herencia dominante. La línea discontinua representa el umbral de significación estadística no ajustado ( $P=0.05$ ). En la parte inferior de la imagen se muestra la estructura haplotípica y la localización de cada SNP en cada bloque haplotípico.

Un análisis de asociación de los haplotipos confirmó los resultados, pero no incrementó la fuerza de la asociación (no mostrado). Este estudio reveló que únicamente el haplotipo del gen *CD40L* formado por los alelos G-G-T-T-G-C (de acuerdo con el orden de los SNPs mostrado en la Figura 37) y con una frecuencia del 2.2%, impuso una diferencia negativa en el valor Z de

columna de -0.79 (IC 95%: -1.26 a -0.36;  $P=0.0003$ ) comparado con el haplotipo común A-G-T-T-G-T.

La Tabla 22 muestra las características epidemiológicas de la cohorte bajo un modelo de herencia recesivo para el SNP rs1883832 del gen *CD40* y dominante para el SNP rs1126535 del gen *CD40L*.

**Tabla 22.** Características epidemiológicas de la cohorte de estudio de acuerdo con los genotipos para rs1883832 (*CD40*) y rs1126535 (*CD40L*).

	N	rs1883832 (CD40)		P-valor	rs1126535 (CD40L)		P-valor
		TT (N=68)	CC/CT (N=711)		TT (N=538)	CC/CT (N=230)	
Edad (años)	779	53.9±6.2	52.6±6.4	0.122	52.6±6.04	53.2±7.0	0.229
Peso (kg)	779	67.0±10.3	66.1±11.1	0.524	66.3±10.5	66.0±12.1	0.604
Altura (cm)	779	158.6±6.8	157.6±6.2	0.199	157.6±6.3	157.5±6.1	0.878
Estado postmenop. (%)	779	92.0	87.6	0.295	88.1	88.2	0.961
Menopausia quirúrgica (%)	779	29.7	24.9	0.375	24.0	27.0	0.336
Usuarías TH (%)	779	23.5	27.3	0.505	26.7	27.4	0.836

TH, terapia hormonal

En la Tabla 23 se detallan las características bioquímicas y óseas de la población, ajustadas por las covariables edad, peso, altura, estado menopáusico, tipo menopausia y uso de TH.

Para el SNP rs1883832 del gen *CD40*, las mujeres de genotipo CC/CT mostraron mejores parámetros óseos ( $P<0.05$ ) que las mujeres de genotipo TT, aunque las diferencias perdieron la significación estadística tras aplicar el test para comparaciones múltiples (test FDR;  $Q$ -valores $>0.05$ ). Sin embargo, encontramos que las mujeres de genotipo TT mostraban una clara tendencia a tener un menor nivel de OPG ( $P$  ajustada=0.0049;  $Q=0.059$ ) tal como se muestra en la Tabla 23. Este hallazgo constituye una evidencia indirecta del empeoramiento del estatus óseo de las pacientes con este genotipo y establece un nexo de unión entre *CD40* y niveles de OPG.

**Tabla 23.** Características bioquímicas y óseas de la cohorte de la población de estudio de acuerdo con su genotipo para rs1883832 (*CD40*) y rs1126535 (*CD40L*). Los valores son la media marginal estimada  $\pm$ DE.

	rs1883832 ( <i>CD40</i> )				rs1126535 ( <i>CD40L</i> )				
	N	TT (N=68)	CC/CT (N=711)	P-valor	Q-valor	TT (N=538)	CC/CT (N=230)	P-valor	Q-valor
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	709	38.1 $\pm$ 4.7	29.0 $\pm$ 2.3	<b>0.042</b>	0.084	23.7 $\pm$ 1.7	27.0 $\pm$ 2.3	0.164	0.394
<b>PTH (pg/ml)</b>	348	42.9 $\pm$ 2.6	46.4 $\pm$ 0.9	0.198	0.264	45.9 $\pm$ 1.1	46.4 $\pm$ 1.6	0.767	0.824
<b>CTx (ng/ml)</b>	560	0.38 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.01	0.144	0.216	0.42 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	0.824	0.824
<b>Calcio (mg/dl)</b>	711	9.7 $\pm$ 0.1	9.6 $\pm$ 0.0	0.286	0.343	9.6 $\pm$ 0.0	9.6 $\pm$ 0.0	0.113	0.369
<b>Fosfato (mg/dl)</b>	710	3.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.0	0.085	0.146	3.6 $\pm$ 0.0	3.7 $\pm$ 0.0	0.123	0.369
<b>FA Total (U/L)</b>	619	172.9 $\pm$ 5.8	167.4 $\pm$ 1.9	0.359	0.392	168.0 $\pm$ 2.4	171.6 $\pm$ 3.4	0.367	0.549
<b>25(OH)D3 (ng/ml)</b>	335	25.4 $\pm$ 3.2	27.1 $\pm$ 0.8	0.605	0.605	26.8 $\pm$ 0.7	25.5 $\pm$ 1.0	0.298	0.511
<b>OPG (pg/ml)</b>	510	89.3 $\pm$ 4.8	103.7 $\pm$ 1.8	<b>0.0049</b>	0.059	103.2 $\pm$ 2.0	99.1 $\pm$ 3.1	0.260	0.511
<b>DMOe- CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	744	0.779 $\pm$ 0.015	0.811 $\pm$ 0.004	<b>0.032</b>	0.084	0.818 $\pm$ 0.007	0.823 $\pm$ 0.009	0.586	0.703
<b>Valor Z CF</b>	744	-0.304 $\pm$ 0.127	-0.029 $\pm$ 0.038	<b>0.039</b>	0.084	-0.072 $\pm$ 0.044	-0.005 $\pm$ 0.069	0.412	0.549
<b>DMOe- CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	749	0.959 $\pm$ 0.029	1.034 $\pm$ 0.008	<b>0.012</b>	0.071	1.018 $\pm$ 0.009	1.054 $\pm$ 0.011	<b>0.0021</b>	<b>0.013</b>
<b>Valor Z CL</b>	749	-0.531 $\pm$ 0.242	0.052 $\pm$ 0.068	<b>0.020</b>	0.080	-0.083 $\pm$ 0.072	0.243 $\pm$ 0.096	<b>0.0011</b>	<b>0.013</b>

*PTH*, hormona paratiroidea; *CTx*, telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I; *FA*, fosfatasa alcalina; *25(OH) D3*, hidroxicolecalciferol; *OPG*, osteoprotegerina; *CF*, cuello femoral; *CL*, columna lumbar.

Para determinar diferencias entre grupos de población bien delimitados, una estrategia comúnmente utilizada es la comparación de fenotipos extremos. En este sentido, al seleccionar solamente aquellas mujeres que presentaran valor de OPG (N=510) y restringir la selección a aquellas que constituían los

cuartiles finales para el valor Z de CF y CL, los niveles de OPG fueron significativamente mayores en el grupo de alta masa ósea para ambas localizaciones (Tabla 24).

Cuando se analizó la distribución de los genotipos para rs1883832 (*CD40*), las mujeres con genotipo TT se distribuyeron en el grupo de baja masa ósea y bajos niveles de OPG, al contrario de lo que ocurría en el grupo de mujeres con genotipo CC/CT, con una distribución resultante significativamente diferente para las dos localizaciones óseas (CF y CL).

Para el SNP rs1126535 del gen *CD40L*, las mujeres de genotipo CC/CT mostraron mejores valores en los parámetros óseos en la CL que los de las mujeres TT (Tabla 24). Éstos permanecieron como significativos incluso tras aplicar el test FDR.

**Tabla 24.** Estratificación de las mujeres con valor de OPG (N=510) en relación a la DMOe. Alta y Baja representan los cuartiles extremos para los valores Z tanto de CF como de CL. Los valores son la media±DE o bien recuentos. Los valores *P* se obtuvieron a partir de un test ANOVA o Chi cuadrado (2x2) (para distribución de genotipos entre masa ósea Alta/Baja).

	Masa ósea		<i>P</i> -valor
	Alta (N=127)	Baja (N=128)	
<b>Valor Z CF</b>	1.348±0.669	-1.128±0.431	<b>&lt;0.000</b>
<b>OPG (pg/ml)</b>	107.3±37.3	96.0±34.6	<b>0.013</b>
<b>rs1883832 (<i>CD40</i>)</b>			
<b>TT / CC+CT</b>	9 / 118	22 / 106	<b>0.020</b>
	Alta (N=128)	Baja (N=127)	
<b>Valor Z CL</b>	0.915±0.972	-0.644±0.745	<b>&lt;0.000</b>
<b>OPG (pg/ml)</b>	105.6±37.7	96.1±35.8	<b>0.041</b>
<b>rs1883832 (<i>CD40</i>)</b>			
<b>TT / CC+CT</b>	10 / 118	26 / 101	<b>0.004</b>

## **4.2. Identificación de nuevos genes candidatos a la asociación a DMO**

### **4.2.1. Ensayos traslaciones a partir de un modelo animal**

Con el objetivo de identificar nuevos genes candidatos asociados al riesgo de osteoporosis en la mujer, se llevaron a cabo estudios traslacionales usando un modelo animal de pérdida ósea acelerada. Efectivamente, se usó el modelo de ratón ovariectomizado que el grupo viene estudiando con frecuencia como modelo de pérdida ósea acelerada debido a deficiencia estrogénica (García-Pérez *et al.* 2006a; Cano *et al.* 2008). Se llevaron a cabo dos experimentos distintos y en ambos se determinó la expresión génica a gran escala mediante *microarrays* de Affymetrix.

#### **4.2.1.1. Análisis del perfil de expresión génica de la médula ósea de la ratona OVX**

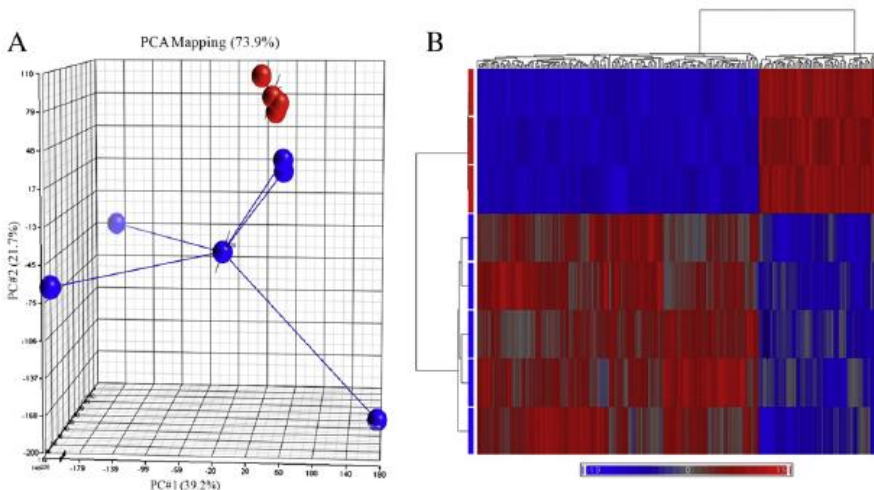
El objetivo del primer estudio fue analizar las diferencias entre el perfil de expresión génica de médula ósea completa en 22 ratonas ovariectomizadas (OVX) con respecto a la de 13 ratonas falsamente operadas (SHAM). La particularidad de este estudio radicó en que los ARNs de las muestras se agruparon en *pools* de 4-5 muestras cada uno: tres para ratonas SHAM (nombrados C1-C3) y cinco para ratonas OVX (nombrados O1-O5). La generación de *pools* de ARN es un método estandarizado para reducir efectos de las replicaciones biológicas (Kendzierski *et al.* 2003).

Las diferencias globales en cuanto a expresión génica entre ambos tipos de muestras se establecieron mediante el estudio del análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) y del agrupamiento jerárquico, usando el *software Partek Genomic Suite software* (Agilent). En el análisis del agrupamiento jerárquico, el test de disimilitud de Pearson se usó para estimar las diferencias entre las distintas filas del dendograma.

Por otra parte, el PCA se usó para detectar las interrelaciones entre los *pools* de muestras usados en este estudio. El PCA es una técnica de extrapolación usada para definir la estructura de datos de grandes dimensiones (como por ejemplo datos de *microarrays*) reduciendo su dimensionalidad. El

análisis de las proyecciones de estos componentes en los ejes espaciales provee de unos patrones de expresión génica para cada grupo de muestras.

La Figura 38.A muestra el PCA para los 8 *pools* de muestras (5 *pools* para ratonas OVX y 3 *pools* para ratonas SHAM) y la media para cada grupo. Los dos grupos se separan claramente en dos conjuntos, mostrando que los perfiles de expresión génica son esencialmente diferentes, aunque las muestras del grupo OVX mostraron una mayor dispersión que las del grupo de controles SHAM. La agrupación jerárquica recoge entidades similares en cada grupo, produciendo un dendograma que muestra la jerarquía dentro de cada grupo (Figura 38.B).



**Figura 38.** **A)** Análisis de componentes principales (PCA). **B)** Agrupación jerárquica de los datos transcriptómicos de las ratonas SHAM (rojo) y OVX (azul).

El resultado muestra que hay una gran concordancia entre los perfiles obtenidos tras la hibridación con ARNm de ratonas SHAM entre sí, así como entre aquellos hibridados con el ARNm de ratonas OVX. Este resultado se ve apoyado por la imagen del PCA ya que, a pesar de que existe dispersión en los *pools* de ARN de ratonas OVX (puntos azules en la figura), la expresión génica de ambos grupos de muestras puede ser fácilmente agrupada.



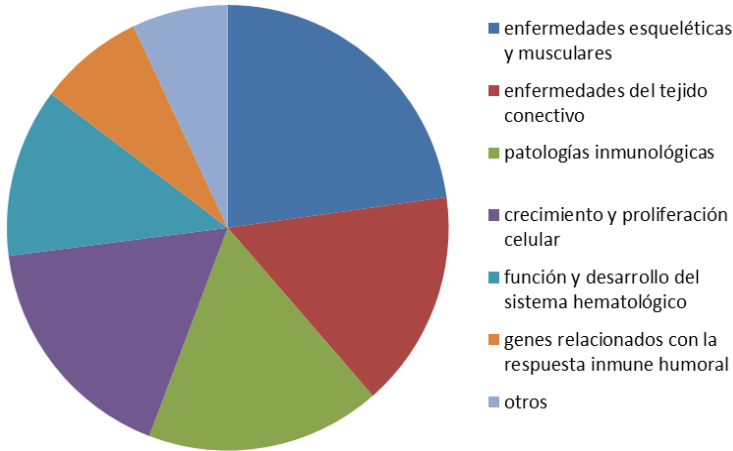
✓ **Análisis del perfil de expresión génica tras la ovariectomía**

Con el fin de detectar y cuantificar la expresión génica diferencial inducida por la OVX, se utilizó el *software* T-Rex (Tools for RElevant gene seleXion), un módulo específico del *software* GEPAS suite (integrado actualmente en Babelomics v5 ([www.babelomics.org](http://www.babelomics.org))) que lleva a cabo un test t-Student para cada gen entre las medias de ambos grupos de *microarrays*. En el presente trabajo, solo fueron considerados como estadísticamente significativos los valores de *P* ajustados  $<0.0007$  y con un valor de FDR  $<0.15$  entre los grupos. De esta manera, el análisis mostró 180 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 120 se encontraban sobreexpresados (66.7%) y 60 infraexpresados (33.3%). La lista de los genes diferencialmente expresados se encuentra en el ANEXO III. El signo del estadístico T para cada gen indica si su expresión estuvo aumentada tras la OVX (signo +) o disminuida (signo -).

✓ **Identificación y clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados tras la OVX**

Para clasificar los genes inducidos por la OVX en términos de la función biológica, se utilizó el *software* IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen). Esta clasificación mostró que la OVX altera la expresión de genes involucrados en funciones biológicas tales como enfermedades esqueléticas y musculares y con patologías relacionadas con el tejido conectivo (Figura 39).

Las cinco rutas canónicas más representadas, según su significación estadística, incluyeron el desarrollo de células B ( $P=1.3\times 10^{-7}$ ), la señalización en inmunodeficiencias primarias ( $P=2.9\times 10^{-6}$ ), la señalización a través de PI3K en linfocitos B ( $P=5.7\times 10^{-5}$ ), la señalización a través de la fosfolipasa C ( $P=6.1\times 10^{-5}$ ), y la señalización a través de FcγRIIB en linfocitos B ( $P=7.3\times 10^{-4}$ ).

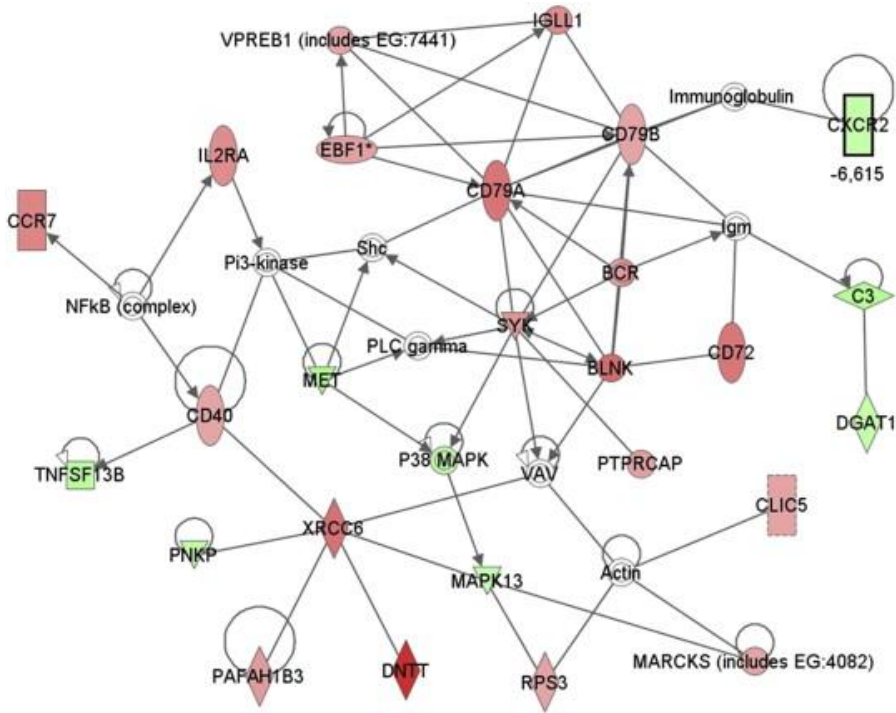


**Figura 39.** Representación de las principales funciones de los genes alterados tras la ovariectomía.

El análisis IPA mostró 23 rutas de señalización significativas (puntuación > 2), de las que las 10 más significativas (puntuación > 12) se muestran en el ANEXO VI. La ruta que ocupa el primer lugar en el *ranking* (puntuación = 43, moléculas clave = 25) está asociada al desarrollo celular, desarrollo y función del sistema hematológico y la respuesta inmune humoral (Figura 40).

La red que aparece en la Figura 40 está centrada en genes como el *Bcr* (*B-cell receptor*; receptor de la célula B) y sus miembros *Cd79a* y *Cd79b* (los antígenos alfa y beta asociados a la inmunoglobulina), *Blnk* (*B-cell linker*), *Syk* (tirosin-quinasa del bazo), y el gen *Cd40* (miembro 5 de la superfamilia del receptor TNF). Todos estos genes participan en procesos tales como la activación de la célula B, su diferenciación, proliferación y señalización de su receptor, así como en la respuesta inmune humoral y la respuesta inflamatoria, las rutas de transducción de señal intracelulares, y la regulación positiva de la resorción ósea, entre otros (Seda and Mraz 2014). Las funciones principales de las otras rutas significativamente destacadas están asociadas a desórdenes musculoesqueléticos (por ejemplo, *Galnt3*, *Ebf1*, *Ibsp*, *Gata1*, *Sox4*, o genes *Gh*), señalización de la fosfolipasa C, señalización a través de PI3K en linfocitos B, muerte celular, desórdenes del sistema endocrino, metabolismo

lipídico, ensamblaje celular y organización de la señalización celular, patologías hematológicas, entre otras (ANEXO VI).



**Figura 40.** Ruta más significativa regulada por la OVX en la médula ósea del ratón. La intensidad del color del nodo indica el grado de regulación positiva (rojo) o regulación negativa (verde). Solamente se representan las relaciones directas entre genes. (Gráfico obtenido con *software* IPA).

✓ **Validación del análisis de *microarrays* mediante un análisis MassARRAY QGE**

Existe un consenso en que los resultados de experimentos de *microarrays* deben ser validados mediante otras técnicas cuantitativas (Chuaqui *et al.* 2002). Para la validación de los resultados obtenidos en el experimento de *microarrays* en el presente trabajo se llevó a cabo un análisis mediante MassARRAY QGE usando las mismas muestras de ARN que las usadas para el estudio de *microarrays* en 12 genes seleccionados. En este

caso, las muestras fueron analizadas individualmente en vez de en *pools* (Tabla 25).

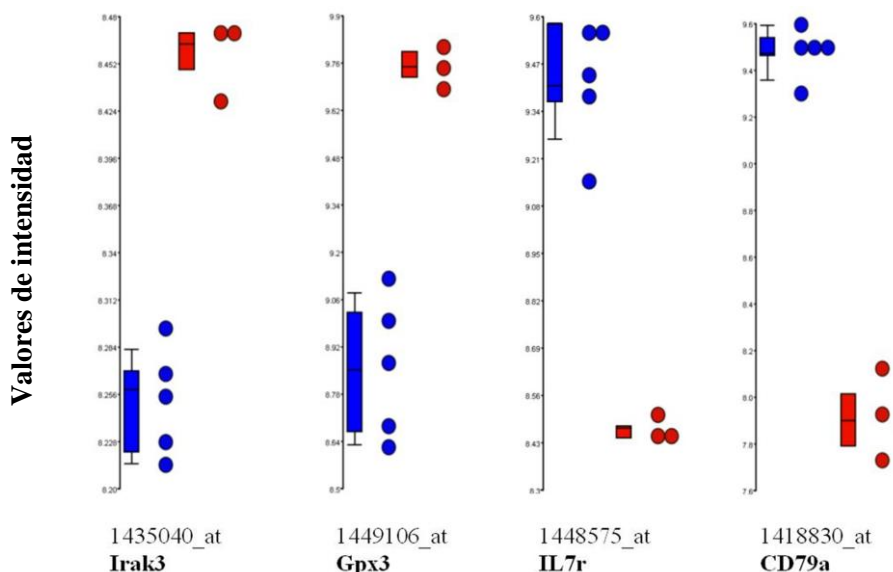
**Tabla 25.** Validación de los resultados de *microarray* mediante MassARRAY QGE (Sequenom). El estadístico T es el valor obtenido del análisis de expresión génica diferencial obtenido del *software* T-Rex (GEPAS suite). La ratio OVX/SHAM resulta de dividir la concentración molar de cada gen en la médula ósea entre las ratonas OVX (N=12) y ratonas SHAM (N=12) obtenidos con el Sequenom. Las secuencias de los cebadores de la PCR y de los competidores se muestran en el ANEXO VII.

Gen	Estadístico T (GEPAS)	Ratio OVX/SHAM (Sequenom)	P-valor (Sequenom)
<b>Dntt</b>	17.4	2.20	0.170
<b>Sox4</b>	12.7	2.35	0.099
<b>Il7r</b>	12.4	2.61	<b>0.037</b>
<b>Dpp4</b>	12.3	2.56	<b>0.00006</b>
<b>Blnk</b>	11.3	3.52	<b>0.0003</b>
<b>CD79a</b>	10.3	2.59	<b>0.00003</b>
<b>CD72</b>	10.2	2.31	<b>0.002</b>
<b>Capsl</b>	9.5	2.35	<b>0.015</b>
<b>Cpm</b>	8.2	2.88	<b>0.0002</b>
<b>Tnfrsf19</b>	6.9	2.08	0.148
<b>CD40</b>	6.5	1.82	0.320
<b>Gpx3</b>	-7.8	0.39	<b>0.004</b>

Como se puede apreciar en la Tabla 25, se detectaron diferencias significativas entre ratonas SHAM y OVX para 8 de los 12 genes examinados usando esta técnica, indicando que el estudio de *microarrays* proporciona resultados de comparaciones fiables entre ambos grupos de ratonas. La concordancia entre las diferencias significativas no fue del 100% probablemente debido a la dispersión en la concentración molar de ARN para algunos genes, pudiendo oscilar desde  $10^{-16}$  a  $10^{-22}$  M.

#### 4.2.1.1.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos (*GPX3*, *IRAK3*, *IL7R* y *CD79A*)

El objetivo principal de este estudio fue encontrar genes cuya expresión fuese modificada en respuesta a la OVX para analizar la asociación de variaciones en estos genes al fenotipo óseo en nuestra cohorte de mujeres postmenopáusicas usando una aproximación traslacional. De esta manera, decidimos estudiar en nuestra cohorte de mujeres la asociación a DMOe de dos genes que mostraron una menor expresión tras la ovariectomía (*GPX3* e *IRAK3*) y dos genes que incrementaron su expresión en las ratonas OVX (*CD79A* e *IL7R*).



**Figura 41.** Intensidad de fluorescencia de cada *pool* para los genes seleccionados. En rojo se muestran los valores obtenidos por los *pools* de muestras SHAM, y en azul se muestran los valores para muestras OVX.

La Figura 41 muestra la intensidad de fluorescencia para cada *pool* de muestras (azul: OVX; rojo SHAM) mostrando que, con respecto a la OVX, la expresión génica para *Irak3* y *Gpx3* en las muestras SHAM estuvo disminuida, mientras que la expresión génica de *Il7r* y *CD79a* estuvo aumentada.

Las características principales de las 706 mujeres participantes del estudio se detallan en la Tabla 26. Se seleccionaron mujeres con parámetros óseos normales de acuerdo con la edad media, mostrando una osteopenia leve en la CL (Valor T=-1.16 ± 1.41).

**Tabla 26.** Características antropométricas y óseas de la cohorte de mujeres españolas postmenopáusicas estudiadas (media±DE o porcentaje).

	Número	Valores
Edad (años)	706	53.2 ± 6.6
Años desde la menopausia (años)	706	6.2 ± 5.6
Peso (kg)	706	66.3 ± 11.3
Altura (cm)	706	157.3 ± 6.2
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	706	26.8 ± 4.4
Tabaquismo (%)	706	24.5
Usuaris de TH (%)	706	34.6
Menopausia quirúrgica (%)	706	28.0
DMOe- CF (g/cm <sup>2</sup> )	626	0.799 ± 0.122
Valor T CF	626	-0.93 ± 1.05
Valor Z CF	626	-0.09 ± 1.01
DMOe- CL (g/cm <sup>2</sup> )	638	0.993 ± 0.151
Valor T CL	638	-1.16 ± 1.41
Valor Z CL	638	-0.24 ± 1.25

*IMC*, índice masa corporal; *TH*, terapia hormonal; *DMO*, densidad mineral ósea; *CF*, cuello femoral y *CL*, columna lumbar.

La tasa de genotipado para los 15 SNPs analizados fue mayor al 99%. Como ya se ha mencionado en el apartado 3.6.1., en este estudio las frecuencias alélicas fueron similares a las publicadas para otras poblaciones caucásicas y las frecuencias de distribución para 13 de los 15 SNPs fueron consistentes con el EHW. Los otros dos SNPs (rs1168771 y rs1623665, ambos del gen *IRAK3*) mostraron desviaciones de EHW con valores *P* nominales < 0.05 (0.028 y 0.025 respectivamente). Sin embargo, ambos permanecieron bajo el umbral de significación de 0.0009 tras la corrección por comparaciones múltiples.

Mediante un estudio ANOVA preliminar, sin corregir por covariables (Tabla 27), se detectaron asociaciones significativas y/o tendencias sugestivas de asociación del SNP rs8177447 en el gen *GPX3* con la DMOe-CF ( $P=0.114$ ) y de los SNPs rs3810153 y rs1428922 en el gen *CD79A* con la DMOe-CL ( $P=0.077$  y  $P=0.018$ , respectivamente). El *software* SNPStats asignó un modelo de herencia dominante al SNP rs8177447 (alelo dominante T,  $P=0.048$ ) en el gen *GPX3* y modelo de herencia recesivo para el SNP rs3810153 (alelo recesivo G,  $P=0.047$ ) y el rs1428922 (alelo recesivo A,  $P=0.009$ ) en el gen *CD79A*.

**Tabla 27.** Frecuencias genotípicas, modelo de herencia y análisis ANOVA para los polimorfismos (Media±DE).

Gen	SNP	Genotipo	Frecuencia genotípica	DMOe-CF	DMOe-CL
<i>GPX3</i>	rs1946234	A/A	571 (0.81)	0.798±0.123	0.995±0.149
		A/C	127 (0.18)	0.808±0.118	0.990±0.160
		C/C	7 (0.01)	0.753±0.113	0.961±0.130
			<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.44 (recesivo)	0.57 (recesivo)
	rs3792796	C/C	271 (0.39)	0.787±0.118	0.989±0.138
		C/G	315 (0.45)	0.805±0.123	0.997±0.157
		G/G	112 (0.16)	0.806±0.126	0.994±0.162
			<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.22 (dominante)	0.6 (dominante)
	rs8177447	C/C	429 (0.61)	0.791±0.119	0.990±0.146
		C/T	244 (0.35)	0.813±0.126	1.000±0.156
		T/T	33 (0.05)	0.797±0.122	0.992±0.170
			<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.114 (dominante)	0.34 (dominante)
<i>IL7R</i>	rs6897932	C/C	410 (0.58)	0.800±0.123	0.991±0.153
		C/T	247 (0.35)	0.795±0.118	0.995±0.146

Resultados

		T/T	45 (0.06)	0.812±0.134	1.018±0.157
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.7 (recesivo)	0.32 (dominante)
rs11567705	C/C		408 (0.58)	0.800±0.123	0.990±0.153
	C/G		247 (0.35)	0.796±0.118	0.996±0.146
	G/G		44 (0.07)	0.820±0.126	1.021±0.158
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.46 (recesivo)	0.28 (dominante)
rs2228141	C/C		483 (0.69)	0.796±0.124	0.997±0.147
	C/T		200 (0.28)	0.808±0.119	0.985±0.157
	T/T		19 (0.03)	0.777±0.113	1.016±0.167
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.37 (dominante)	0.14 (dominante)
<b>CD79A</b>	rs3810153	A/A	240 (0.35)	0.805±0.134	1.010±0.168
		A/G	331 (0.48)	0.798±0.115	0.990±0.137
		G/G	114 (0.17)	0.788±0.113	0.968±0.150
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.39 (recesivo)	0.077 (recesivo)
rs1428922	A/A		164 (0.23)	0.791±0.120	0.964±0.151
	A/G		365 (0.52)	0.799±0.115	0.995±0.142
	G/G		172 (0.25)	0.807±0.138	1.016±0.165
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.28 (recesivo)	<b>0.018</b> (recesivo)
<b>IRAK3</b>	rs1732887	T/T	356 (0.51)	0.797±0.120	0.995±0.152
		T/C	280 (0.40)	0.802±0.124	0.995±0.146
		C/C	64 (0.09)	0.803±0.129	0.985±0.165
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.53 (recesivo)	0.69 (dominante)
rs1168771	C/C		129 (0.19)	0.793±0.126	1.010±0.151
	C/T		306 (0.44)	0.794±0.121	0.986±0.152
	T/T		257 (0.37)	0.809±0.123	0.993±0.149
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)		0.061 (dominante)	0.57 (recesivo)



Identificación de genes y polimorfismos asociados a fenotipos óseos

rs1168760	A/A	616 (0.89)	0.798±0.122	0.995±0.150
	A/T	78 (0.11)	0.801±0.119	0.986±0.157
	T/T	1 (0.00)	0.679	0.910
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.3 (recesivo)	0.54 (recesivo)
rs2289134	T/T	326 (0.47)	0.806±0.121	0.989±0.153
	T/C	282 (0.41)	0.789±0.117	0.988±0.146
	C/C	83 (0.12)	0.804±0.135	1.022±0.159
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.12 (dominante)	0.29 (recesivo)
rs1152888	A/A	1 (0.00)	0.678	0.9102
	A/G	78 (0.11)	0.798±0.117	0.984±0.155
	G/G	622 (0.89)	0.800±0.123	0.995±0.150
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.29 (recesivo)	0.46 (dominante)
rs1623665	G/G	280 (0.40)	0.806±0.121	0.992±0.149
	G/T	300 (0.43)	0.795±0.120	0.990±0.152
	T/T	115 (0.17)	0.793±0.130	1.010±0.152
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.095 (dominante)	0.73 (recesivo)
rs1152916	A/A	193 (0.28)	0.793±0.130	0.996±0.157
	A/T	348 (0.50)	0.803±0.120	0.998±0.150
	T/T	155 (0.22)	0.799±0.118	0.981±0.144
		<i>P</i> -valor (mejor modelo)	0.54 (dominante)	0.32 (recesivo)

De hecho, al realizar un análisis combinado entre las diversas opciones para cada genotipo, se demostró que las mujeres con genotipos CT/TT para el SNP rs8177447 (*GPX3*) y con genotipos AA/AG para el SNP rs3810153 y GG/GA para el SNP rs1428922 (ambos del gen *CD79A*) mostraban mejores parámetros óseos tanto en cadera como en columna. Estos datos se muestran en la Tabla 28 , donde se representa la DMOe de CF y CL y los valores Z en

nuestra población de acuerdo con estas combinaciones, ajustados por las covariables edad, ADM, peso, tabaquismo, uso de terapia hormonal y tipo de densitómetro.

Las mujeres con genotipo CC para rs8177447 mostraron un deterioro significativo del hueso en CF, y se observó una tendencia similar para CL. De la misma manera, las mujeres de genotipo GG para rs3810153 y AA para rs1428922 mostraron peores parámetros óseos en CL que las demás mujeres, con especial significación para el último SNP (DMOe-CL;  $P=0.001$ , valor Z de CL:  $P=0.002$ ).

**Tabla 28.** Valores de DMOe de CF y CL y valores Z ajustados por covariables en nuestra población según el genotipo para los SNPs rs8177447 (*GPX3*), rs3810153 (*CD79A*) y rs1428922 (*CD79A*).

Locus	CUELLO FEMORAL		COLUMNA LUMBAR	
	DMOe (g/cm <sup>2</sup> )	Valor Z	DMOe (g/cm <sup>2</sup> )	Valor Z
<b>rs8177447</b>				
<b>(<i>GPX3</i>)</b>				
CC	0.793 ± 0.006	-0.16 ± 0.05	0.990 ± 0.007	-0.29 ± 0.06
CT/TT	0.813 ± 0.008	0.02 ± 0.07	1.002 ± 0.009	-0.16 ± 0.08
<b>P-valor</b>	<b>0.043</b>	<b>0.031</b>	0.331	0.202
<b>rs3810153</b>				
<b>(<i>CD79A</i>)</b>				
AA/AG	0.805 ± 0.005	-0.06 ± 0.04	1.001 ± 0.006	-0.19 ± 0.05
GG	0.786 ± 0.011	-0.23 ± 0.10	0.964 ± 0.014	-0.48 ± 0.12
<b>P-valor</b>	0.134	0.107	<b>0.016</b>	<b>0.024</b>
<b>rs1428922</b>				
<b>(<i>CD79A</i>)</b>				
GG/GA	0.805 ± 0.005	-0.06 ± 0.05	1.005 ± 0.007	-0.16 ± 0.06
AA	0.789 ± 0.010	-0.20 ± 0.09	0.959 ± 0.012	-0.52 ± 0.10
<b>P-valor</b>	0.168	0.139	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>

*Los valores son la media±EE. (Corrección p.h: Bonferroni)*

Finalmente se llevó a cabo un estudio de regresión logística múltiple de acuerdo con los genotipos de los SNPs rs8177447 (*GPX3*), rs3810153 (*CD79A*) y rs1428922 (*CD79A*), que se muestra en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Estimación del riesgo de osteoporosis/osteopenia en CF y CL ajustando por edad, ADM, IMC, tipo de densitómetro, tabaquismo y uso de TH de acuerdo con los genotipos que estaban asociados a DMOe.

	<b>Genotipo</b>	<b>P-valor</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Cuello femoral</b>	CC vs. CT/TT (rs8177447)	<b>0.014</b>	1.548	1.090-2.196
<b>Columna lumbar</b>	GG vs. AA/AG (rs3810153)	<b>0.012</b>	1.816	1.139-2.894
	AA vs. GG/GA (rs1428922)	<b>0.013</b>	1.706	1.121-2.597

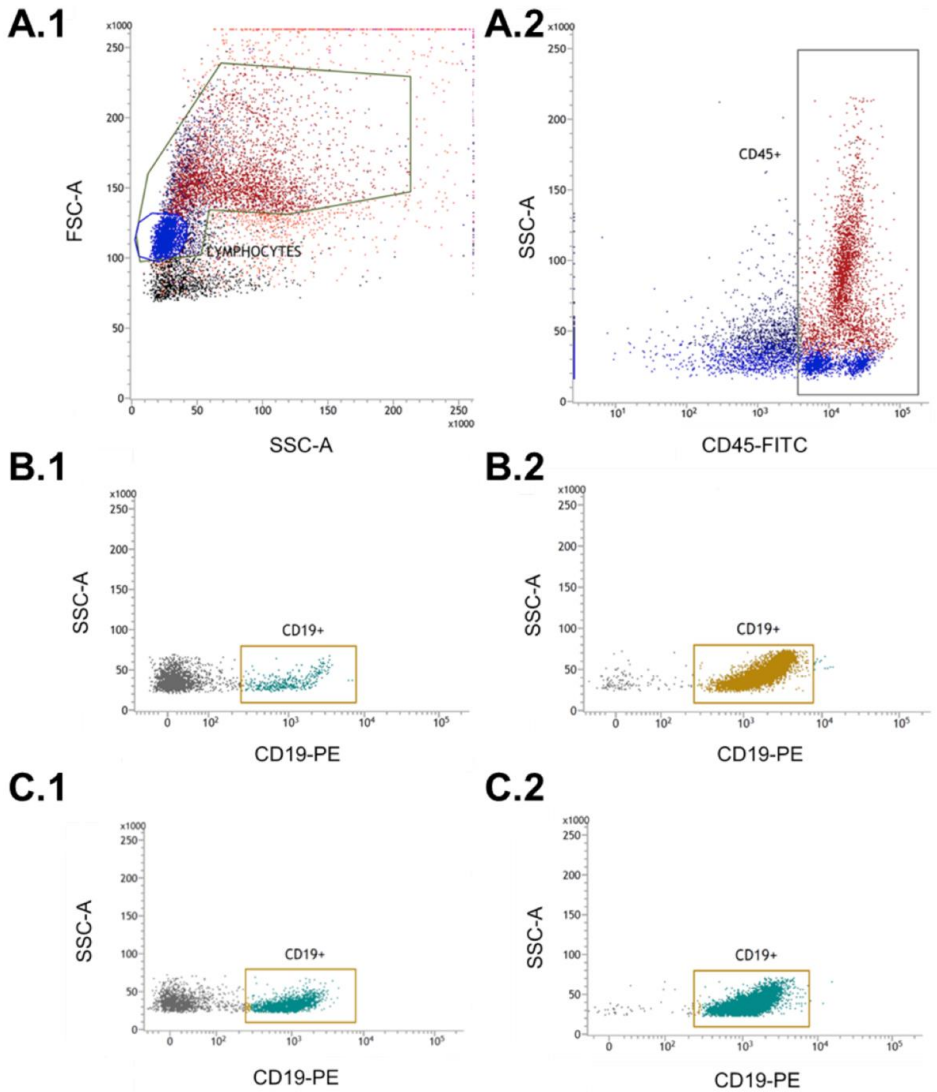
(Corrección p.h: Bonferroni)

Para este estudio se seleccionaron tanto mujeres con osteoporosis como con osteopenia porque, en nuestra población menos del 4.9% de las mujeres tiene osteoporosis de CF ( $T < -2.5$ ).

Para el CF, el *odds ratio* de osteopenia/osteoporosis para mujeres con genotipo CC para rs8177447 comparado con las mujeres CT/TT fue ligeramente superior (*OR*: 1.5,  $P=0.014$ ), pero el riesgo de osteopenia/osteoporosis fue significativamente superior para mujeres con genotipo GG para el SNP rs3810153 y AA para el rs1428922 (*OR*: 1.8 y 1.7, respectivamente).

#### 4.2.1.2. Análisis del perfil de expresión génica de la célula B tras la OVX

Tras la obtención de los datos de la médula ósea total, y debido al papel central que parecía tener la célula B en las rutas diferencialmente expresadas, se decidió estudiar las diferencias de expresión génica en la subpoblación de células B CD19<sup>+</sup> de médula ósea, para lo cual se usaron 6 ratonas SHAM y 8 OVX de 15 semanas de edad. Una vez pasadas 4 semanas de la intervención, se obtuvo la médula ósea de los fémures de todas las ratonas ya que ninguno de ellos mostró evidencia de efectos secundarios durante el proceso experimental.



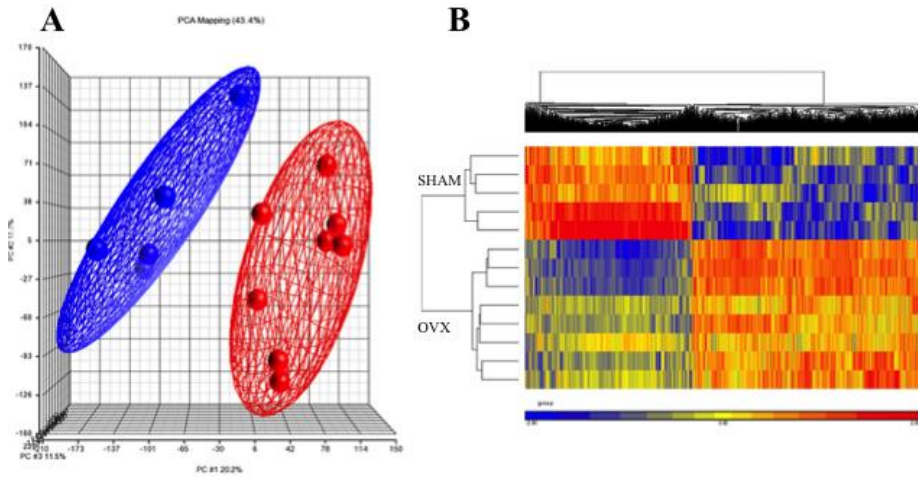
**Figura 42.** Histogramas característicos de citometría de flujo durante la inmunopurificación magnética. **(A1)** Morfología general de las células de la médula ósea completa **(A2)** La región gateada (rectángulo negro) representa las células CD45<sup>+</sup>. **(B)** Porcentaje de células CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> en la fracción negativa **(B1)** y positiva **(B2)** tras la inmunopurificación de la médula ósea de ratonas ovariectomizadas. **(C)** Porcentaje de células CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> en la fracción negativa **(C1)** y positiva **(C2)** tras la inmunopurificación de la médula ósea de ratonas SHAM

El *array* se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.4.3, pero en este caso los análisis de expresión génica se llevaron a cabo usando ARNs de muestras individuales. Cuando se analizaron los datos crudos, incluyendo la normalización oportuna, el *software* Partek (Affymetrix) identificó un *outlier* en el grupo SHAM, por lo que éste fue eliminado del estudio.

El porcentaje de células CD19<sup>+</sup> en la fracción positiva fue 91±8.2% (Figura 42). La integridad media del ARN obtenido a partir de las células inmunopurificadas, medida mediante el valor RIN fue 9.93±0.15, indicando un valor de integridad de ARN óptimo.

La Figura 43 muestra el PCA y el agrupamiento jerárquico de las muestras incluidas en este estudio. El PCA se empleó para detectar las relaciones entre las muestras OVX y SHAM. Como se puede observar, los grupos se separan perfectamente, lo que indica que el perfil de expresión génica de ambos grupos es esencialmente diferente. Este perfil de expresión diferente se ve confirmado por el dendograma que ofrece el análisis de agrupamiento jerárquico.

Como se muestra en la Figura 43, las muestras de ARN de ratonas OVX están separados en un *cluster* diferente al de las muestras de ARN procedentes de ratonas SHAM, lo que indica que se encuentran organizadas en diferentes jerarquías. El análisis con el *software* Partek mostró 2791 transcritos significativos (FDR<0.05), de los cuales 2621 correspondían a genes anotados. De estos, 1569 genes se encontraban regulados positivamente (56.2%) y 1122 genes negativamente (43.8%).



**Figura 43.** **A)** Análisis de componentes principales (PCA) y **B)** Agrupamiento jerárquico de los datos del transcriptoma de ratonas SHAM (azul) y OVX (rojo).

### ✓ Identificación y clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados tras la OVX

Con el objetivo de profundizar en los procesos biológicos en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos, se llevó a cabo un análisis de anotación funcional usando el *software* Pathway Studio 10 (Ariadne Genomics® software, Elsevier® Inc, Rockville, MD, EEUUos Unidos).

En la Tabla 30 se muestran los 26 *clusters* génicos más significativos, ordenados según su valor *P*, que van desde  $1.6 \times 10^{-48}$  a  $3.7 \times 10^{-15}$ . En la tabla se detallan el número de entidades totales que se incluyen en ese *cluster*, así como los genes de ese *cluster* que se han expresado diferencialmente en el ensayo (solapamiento), tanto en números crudos como en porcentaje.

**Tabla 30.** Procesos biológicos diferencialmente expresados en las células B de médula ósea del ratón tras la ovariectomía de ratón.

	Entidades totales	Solapamiento	%Solapamiento	P-valor
1 Regulación de la transcripción mediada por ADN	2523	349	13.8	1.62E <sup>-48</sup>
2 Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	1407	235	16.7	1.35E <sup>-45</sup>
3 Transporte	1841	273	14.8	4.80E <sup>-43</sup>
4 Transcripción mediada por ADN	2434	327	13.4	1.45E <sup>-42</sup>
5 Respuesta inmune innata	680	147	21.6	1.08E <sup>-41</sup>
6 Fosforilación	707	138	19.5	4.79E <sup>-34</sup>
7 Regulación positiva de la transcripción mediada por ADN	638	117	18.3	1.67E <sup>-26</sup>
8 Coagulación sanguínea	487	99	20.3	4.03E <sup>-26</sup>
9 Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	916	143	15.6	8.29E <sup>-25</sup>
10 Modificación de proteínas	271	69	25.5	1.98E <sup>-24</sup>
11 Regulación negativa de la transcripción mediada por ADN	557	103	18.5	9.41E <sup>-24</sup>
12 Fosforilación de proteínas	663	111	16.7	6.76E <sup>-22</sup>
13 Ruta de señalización del receptor de la neurotropina TRK	280	65	23.2	9.10E <sup>-21</sup>
14 Regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	707	113	16.0	1.24E <sup>-20</sup>
15 Transducción de señal intracelular	519	92	17.7	4.71E <sup>-20</sup>
16 Transporte de proteínas	647	104	16.1	2.89E <sup>-19</sup>
17 Proceso apoptótico	842	123	14.6	4.68E <sup>-19</sup>
18 Modulación de la morfología o fisiología del hospedador mediante virus	340	69	20.3	1.47E <sup>-18</sup>
19 Adhesión celular	665	102	15.3	1.82E <sup>-17</sup>

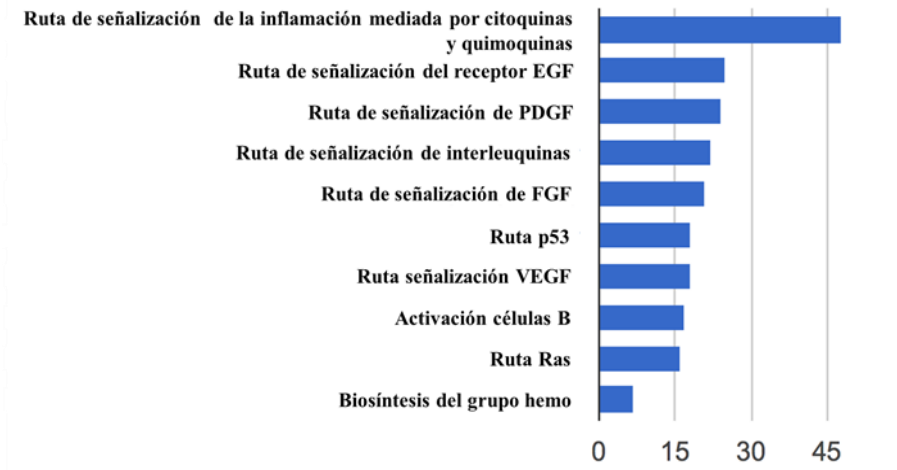
<b>20</b>	<b>Procesos del metabolismo de fosfolípidos</b>	177	46	26.0	3.90E <sup>-17</sup>
<b>21</b>	<b>Respuesta inflamatoria</b>	376	69	18.4	3.61E <sup>-16</sup>
<b>22</b>	<b>Procesos del sistema inmune</b>	327	63	19.3	5.42E <sup>-16</sup>
<b>23</b>	<b>Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico</b>	199	47	23.6	1.01E <sup>-15</sup>
<b>24</b>	<b>Ciclo celular</b>	645	96	14.9	1.16E <sup>-15</sup>
<b>25</b>	<b>Transporte transmembrana</b>	735	104	14.1	2.36E <sup>-15</sup>
<b>26</b>	<b>Regulación positiva del proceso apoptótico</b>	384	68	17.7	3.75E <sup>-15</sup>

Algunos de los procesos principales presentes en estos *clusters*, englobaban transcripción (*clusters* 1, 4, 7, 9, 11 y 14), transporte (3, 16 y 25), inflamación y sistema inmune (5,21 y 22), fosforilación (6 y 12) o apoptosis (17 y 26), entre otros.

Todos los genes seleccionados para la traslación al estudio humano se encontraban entre estos 26 *clusters* génicos. Entre ellos, por ejemplo, *Sox6*, *Hdac5* y *Sox4* se encuentran en el primer *cluster* (Regulación de la transcripción del ADN), *Cd80* y *Tyrobp* están incluidos en el quinto *cluster* génico (Respuesta inmune innata) mientras *Tnfrsf19*, *Il18rap* y *Mmp9* se incluyen en los *clusters* 17 (proceso apoptótico), 21 (respuesta inflamatoria) y 26 (regulación positiva del proceso apoptótico), respectivamente.

Los genes diferencialmente expresados se pueden agrupar a su vez de acuerdo con las rutas descritas en PANTHER (*Protein ANnotation THrough Evolutionary Relationship*) (Mi *et al.* 2016), usando la herramienta web GeneCodis (Tabas-Madrid *et al.* 2012), con el objetivo de determinar la ruta molecular dominante.





**Figura 44.** Rutas de señalización más significativamente diferenciadas en las células B tras la ovariectomía.

Cabe destacar que entre las 10 rutas de señalización más significativamente diferenciadas tras la ovariectomía se encuentran la Inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas ( $P=1.7 \times 10^{-13}$ ), ruta de señalización de Interleuquinas ( $P=4.6 \times 10^{-8}$ ) o la activación de células B ( $P=1.9 \times 10^{-7}$ ). Las rutas más relacionadas con metabolismo óseo y osteoporosis aparecen en la posición 14 (ruta de señalización vía TFG-beta,  $P=7.3 \times 10^{-5}$ ), en la posición 22 (respuesta a estrés oxidativo,  $P=1.3 \times 10^{-4}$ ), y en la posición 25 (ruta de señalización de la vía Wnt,  $P=4.1 \times 10^{-4}$ ). (Figura 44).

#### ✓ Validación del análisis de *microarrays* mediante análisis MassARRAY QGE y qPCR

Para validar los resultados de expresión génica obtenidos en el análisis del *microarray*, se llevó a cabo una validación mediante espectrometría Maldi-TOF (MassARRAY QGE; plataforma Sequenom) para 11 genes o mediante qPCR para 5 genes, usando las mismas muestras de ARN que se analizaron en el experimento de *microarrays*.

En la Tabla 31 se muestra el *Fold change* obtenido del análisis de *microarrays* con el *software* Partek, la ratio OVX/SHAM obtenida del análisis

de Sequenom, que resulta de dividir la concentración molar de cada gen para las ratonas OVX (N=7) por la de los animales SHAM (N=5) y el valor *P*. En el caso de la validación mediante qPCR la ratio se obtuvo determinando la expresión génica relativa de todas las ratonas (OVX, N=8; SHAM, N=6).

**Tabla 31.** Validación de los resultados de *microarrays* mediante un análisis MassARRAY QGE (SEQUENOM) o mediante PCR a tiempo real (qPCR).

Tecnología de validación	Gen	Fold change de <i>microarrays</i> (Partek)	Ratio OVX/SHAM	<i>P</i> -valor
SEQUENOM	<i>Itch</i>	2.32	3.24	<b>0.000005</b>
	<i>Tet1</i>	1.49	2.19	<b>0.0006</b>
	<i>Lef1</i>	1.48	2.31	<b>0.000008</b>
	<i>Sox4</i>	1.40	2.36	<b>0.02</b>
	<i>Arrb1</i>	-1.72	-2.51	<b>0.0002</b>
	<i>Fosl2</i>	-1.97	-2.71	<b>0.000005</b>
	<i>Ccl3</i>	-2.47	-1.97	<b>0.01</b>
	<i>Ccl5</i>	-2.56	-2.56	<b>0.0002</b>
	<i>Mmp9</i>	-2.84	-1.96	<b>0.0007</b>
	<i>Aldh1a1</i>	-3.50	-3.05	<b>0.0001</b>
	<i>Fpr2</i>	-3.53	-3.16	<b>0.00007</b>
qPCR	<i>Hdac5</i>	2.48	1.68	<b>0.003</b>
	<i>Tnfrsf19</i>	1.62	1.64	<b>0.0005</b>
	<i>Smad5</i>	1.38	1.56	<b>0.005</b>
	<i>Clec5a</i>	-3.24	-2.77	<b>0.005</b>
	<i>Sox6</i>	-3.39	-3.88	<b>0.00005</b>

Como se puede observar, la validación vía Sequenom o qPCR obtuvo valores de *Fold change* similares a aquellos obtenidos por el análisis de *microarrays*. Además, para los 16 genes analizados, detectamos diferencias significativas entre ratonas OVX y SHAM, lo que indica que los resultados del estudio de *microarrays* proporcionan comparaciones fiables entre ambos grupos de ratonas.

#### **4.2.1.2.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos (*CD80*, *CD86*, *SOX4*, *IL18*, *SOX6*, *TNFRSF19*, *HDAC5*, *TYROBP* y *MMP*)**

El objetivo principal del presente estudio fue la traslación de los resultados obtenidos en el modelo animal al humano. Para ello, se analizó la asociación de SNPs presentes en genes, directa o indirectamente asociados a las células B tras la ovariectomía, con fenotipos óseos en nuestra cohorte de mujeres posmenopáusicas.

Las características principales de los SNPs estudiados pueden verse en la Tabla 7. La tasa de genotipado para los SNPs analizados fue mayor al 99%. Como se puede observar, la frecuencia del alelo menor (MAF) fue mayor al 5% en todos los SNPs analizados y todos cumplían el EHW. El *software* GenePipe solamente asignó un riesgo medio al SNP rs9550987 (Ser31Thr) del gen *TNFRSF19* y bajo para el SNP rs17576 (Gln279Arg) del gen *MMP9*. Las frecuencias alélicas fueron similares a las recogidas en otras poblaciones caucásicas.

Las principales características de las 895 participantes en este estudio en concreto, están enumeradas en el ANEXO VIII.

Como se puede apreciar, las mujeres mostraron parámetros óseos normales de acuerdo a su edad media, mostrando osteopenia leve en ambas zonas esqueléticas (Valor T de CF  $-1.044 \pm 1.036$ ; Valor T de CL:  $-1.223 \pm 1.365$ ).

Un estudio preliminar mediante el test ANOVA (no mostrado), reveló asociaciones significativas y/o sugestivas para varios de los SNPs con la DMOe. La Tabla 32 muestra los SNPs que mostraron asociación a DMOe-CF o CL, considerando el mejor modelo de herencia en cada caso obtenido por el *software* SNPStats.

**Tabla 32.** Análisis de asociación entre genotipos y fenotipos óseos, sin ajustar y ajustados por las variables confusoras edad, IMC y uso de terapia hormonal. Para simplificar, sólo se han mostrado los valores para los SNPs significativos.

Gen SNP (rs)	Genotipo	DMOe-CF		Genotipo	DMOe-CL	
		Sin ajustar	Ajustado		Sin ajustar	Ajustado
<i>CD80</i> rs867234	G/G	0.796±0.122	0.800±0.005	G/G–G/C	0.989±0.150	0.991±0.005
	G/C–C/C	0.780±0.118	0.793±0.007	C/C	0.899±0.156	0.911±0.028
	<b>P-valor</b>	0.071	0.364	<b>P-valor</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>
<i>CD86</i> rs2681406	T/T	0.785±0.125	0.792±0.005	T/T	0.979±0.155	0.984±0.006
	T/C–C/C	0.802±0.114	0.810±0.007	T/C–C/C	1.001±0.142	0.998±0.009
	<b>P-valor</b>	<b>0.049</b>	<b>0.033</b>	<b>P-valor</b>	<b>0.044</b>	0.198
<i>HDAC5</i> rs228769	C/C	0.783±0.119	0.790±0.005	C/C	0.977±0.148	0.981±0.007
	C/G–G/G	0.803±0.125	0.810±0.006	C/G–G/G	1.001±0.155	1.001±0.008
	<b>P-valor</b>	<b>0.017</b>	<b>0.012</b>	<b>P-valor</b>	<b>0.028</b>	0.054

El SNP rs867234 del gen *CD80* mostró una tendencia a la asociación con DMOe de CF ( $P=0.071$ ), pero resultó significativamente asociado a DMOe de CL ( $P=0.002$ ). Sin embargo, tras ajustar por las covariables edad, IMC y uso de terapia hormonal, solamente permaneció significativa la asociación a DMOe de CL.

De la misma manera, los SNPs rs2681406 y rs228769 de los genes *CD86* y *HDAC5* respectivamente, resultaron significativamente asociados tanto a DMOe de CF como de CL. La asociación a DMOe-CF permaneció incluso tras la corrección por las covariables, además se observó una fuerte tendencia a la asociación del SNP en el gen *HDAC5* con la DMOe de CL ( $P=0.054$ ).

La Tabla 33 muestra un análisis de regresión logística múltiple, ajustado por edad, IMC y uso de terapia hormonal, para evaluar el riesgo de osteoporosis en CF y CL. En ella, aparecen los genotipos incluidos en el

modelo además de la edad ( $P < 0.000$  para osteoporosis tanto en CF como en CL) y del IMC ( $P < 0.000$  para osteoporosis en CL y  $P < 0.05$  para osteoporosis en CF). El uso de terapia hormonal no entró en ningún modelo en ningún caso.

**Tabla 33.** Estimación del riesgo de osteoporosis CL y CF ajustado por edad, IMC y uso de terapia hormonal, de acuerdo con el genotipo y el modelo de herencia.

Gen (SNP)	Fenotipo	Genotipo (N)	Casos (%) <sup>a</sup>	OR ajustado (95% IC)	P-valor
<i>CD80</i> (rs867234)	OTP CL	G/G – G/C (834)	17.4	1	
		C/C (27)	44.4	3.72 (1.64 – 8.44)	<b>0.002</b>
<i>CD86</i> (rs2681406)	OTP CF	T/C – C/C (285)	5.2	1	
		T/T (548)	8.2	2.71 (1.11 – 6.62)	<b>0.028</b>
	OTP CL	T/C – C/C (281)	12.8	1	
		T/T (534)	21.2	1.67 (1.08 – 2.58)	<b>0.020</b>
<i>HDAC5</i> (rs228769)	OTP CF	C/G – G/G (354)	5.9	1	
		C/C (496)	8.5	2.05 (0.99 – 4.24)	0.054
	OTP CL	C/G – G/G (346)	16.2	1	
		C/C (484)	19.6	1.42 (0.95 – 2.11)	0.087
<i>MMP9</i> (rs17576)	OTP CF	A/G – G/G (511)	6.1	1	
		A/A (366)	9.0	1.82 (0.96 – 3.45)	0.068
<i>SOX4</i> (rs1620996)	OTP CL	T/T – T/C (206)	14.1	1	
		C/C (653)	19.8	1.61 (1.00 – 2.60)	0.052

a. Porcentaje de mujeres con ese genotipo que sufren osteoporosis

Como se puede observar en la Tabla 33, además de los SNPs en los genes *CD80*, *CD86* y *HDAC5* que se encontraban asociados en diferente grado a DMOe y riesgo de osteoporosis en ambos sitios esqueléticos, se

incluyen los SNPs de los genes *MMP9* (genotipo de riesgo A/A,  $OR=1.82$ ,  $P=0.068$ ) y *SOX4* (genotipo de riesgo C/C,  $OR=1.61$ ,  $P=0.052$ ).

Finalmente, se estudió la asociación de cada SNP al fenotipo fractura ósea usando un test Chi-cuadrado (Tabla 34). En este caso, se encontró una asociación de este fenotipo con el SNP del gen *CD80* (12.3% de las fracturas en el genotipo G/C-C/C vs. 7.9% en el genotipo G/G) y, lo que resulta muy interesante, al SNP del gen *SOX6* (11.3% de las fracturas en el genotipo A/A vs 6.9% en el genotipo G/G-G/A).

**Tabla 34.** Asociación de SNPs con la prevalencia de fractura osteoporótica de acuerdo con el modelo de herencia. Los valores mostrados son los resultantes tras la corrección de Yates para tablas 2x2.

SNP (Gen)	Genotipo (N)	Casos (%) <sup>a</sup>	X <sup>2</sup>	P-valor
rs867234 (CD80)	G/G (611)	7.9	3.93	<b>0.047</b>
	G/C – C/C (277)	12.3		
rs7117858 (SOX6)	G/G – G/A (356)	6.9	5.25	<b>0.022</b>
	A/A (533)	11.3		

a. Porcentaje de mujeres con ese genotipo que sufren osteoporosis

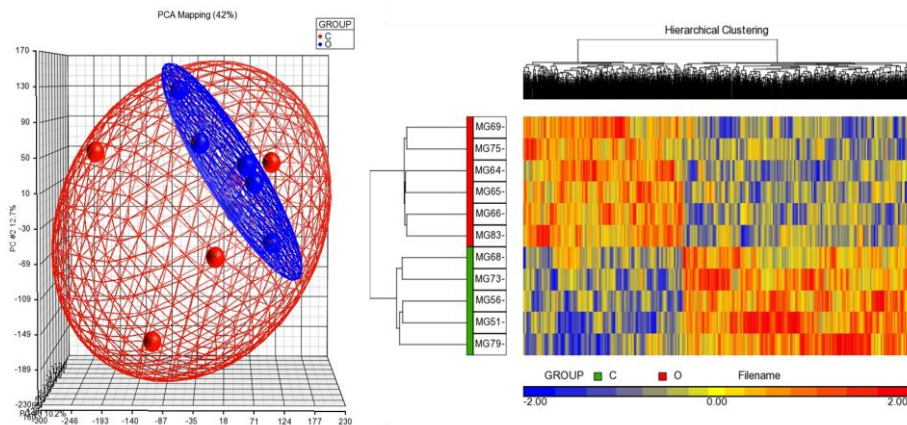
#### 4.2.2. Ensayo traslacional a partir de un modelo celular humano: Análisis del perfil de expresión génica de la fractura por fragilidad

Se realizó un estudio para analizar la expresión génica diferencial entre osteoblastos primarios obtenidos de mujeres con fractura ósea de CF y de mujeres osteoartríticas. En este caso, el ensayo consistió en extraer ARN de 6 cultivos de cada grupo, teniendo en cuenta tanto la calidad de la muestra como la edad de la paciente de la que se obtuvo el cultivo. Una vez se hubo extraído el ARN se llevó a cabo el estudio usando 12 *microarrays* de Affymetrix según lo expuesto en el apartado 3.4.3.

En la Figura 45.A. se muestra el análisis de componentes principales (PCA). Este análisis agrupó las muestras según su procedencia, los datos representados en azul corresponden a las muestras de las pacientes con

fractura ósea por fragilidad o “casos”, mientras que los datos representados en rojo se corresponden a las muestras de las pacientes consideradas controles (sometidas a una intervención para implantar una prótesis de cadera debido a osteoartritis). Así, podemos observar que ambos grupos presentan una expresión génica esencialmente diferente, en tanto en cuanto las muestras pueden agruparse separando dos conjuntos distintos en función de su procedencia.

Este perfil de expresión génica diferencial se confirmó gracias al Análisis de Agrupación Jerárquica, que mostró el dendrograma que se presenta en la Figura 45.B., en el cual se observa que la separación entre ambos conjuntos de muestras es evidente, presentando un perfil de expresión característico para cada uno de los grupos.



**Figura 45.** **A)** Imagen del Análisis de Componentes Principales (PCA) donde se observan los dos grupos: Casos (O, en azul) y Control (C, en rojo) separados en diferentes conjuntos. **B)** Dendrograma del Análisis de Agrupación Jerárquica, en el que se observa que las muestras del grupo Control (C, en verde) y las muestras del grupo Casos (O, en rojo), se encuentran separadas en diferentes jerarquías, confirmando que el perfil de expresión génica es distinto.

✓ **Validación del análisis de *microarrays* por análisis MassARRAY QGE**

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos mediante el análisis de *microarrays* se llevó a cabo un análisis mediante MassARRAY-QGE para 14 de los genes obtenidos usando las mismas muestras de ARN que en el estudio de *microarrays*. Una vez obtenidos los datos de la validación se realizó un test t-Student para obtener el *Fold change* de la validación (esto es de la expresión absoluta del gen en el grupo de los Casos respecto a la expresión para el grupo Controles). Además se obtuvo un valor *P* para comparar los datos de la validación respecto a los datos del *microarray* (Tabla 35).

Como se puede observar en la Tabla 35, se consiguió validar el 71% de los genes testados mediante otra técnica, lo que refuerza los resultados obtenidos por el *microarray*. Los genes que que no consiguieron validarse son los de *Fold change* más bajo.

**Tabla 35** .Validación de los resultados del análisis de *microarrays* mediante un análisis MassARRAY QGE (Sequenom).

<b>Gen</b>	<b><i>Fold Change array</i></b>	<b><i>Fold Change validación</i></b>	<b><i>P</i>-valor</b>
<i>DSG3</i>	2.64	1.99	<b>0.012</b>
<i>SULF2</i>	2.43	2.09	<b>0.010</b>
<i>COL10A1</i>	2.34	2.25	<b>0.004</b>
<i>RSPO3</i>	2.24	2.03	<b>0.024</b>
<i>PRKAR2B</i>	2.01	1.87	<b>0.040</b>
<i>MEF2C</i>	1.62	1.28	0.507
<i>DLX5</i>	1.58	1.25	0.249
<i>GALNT5</i>	-1.64	-1.13	0.681
<i>FOSL1</i>	-1.93	-1.49	0.418
<i>ADAM12</i>	-1.95	-1.87	<b>0.043</b>
<i>ITGA4</i>	-1.99	-1.68	<b>0.007</b>
<i>THSD4</i>	-2.08	-1.77	<b>0.005</b>
<i>LEP</i>	-3.4	-2.84	<b>0.000</b>
<i>IL13RA2</i>	-4.33	-2.84	<b>0.001</b>

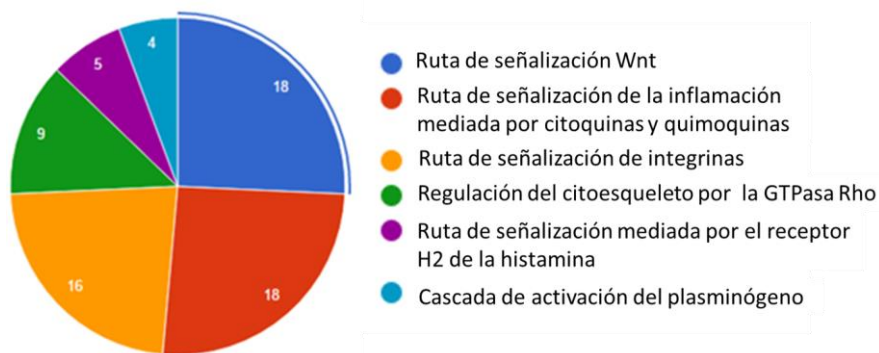


✓ **Identificación y clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados tras la fractura por fragilidad**

Se realizó un análisis ANOVA para detectar la expresión génica diferencial de los genes entre ambos grupos, usando un FDR con un valor  $P < 0.05$ . Así, se comprobó que existían 2657 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 1084 (41%) estaban sobreexpresados y 1573 (59%) infraexpresados. Todos estos genes presentaron un *Fold change* entre -4.33 y 3.95.

En este caso, para analizar los procesos biológicos en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados se usó la herramienta web *GeneCodis* (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) (Tabas-Madrid *et al.* 2012).

En la Figura 46 se observan las rutas biológicas implicadas según los resultados obtenidos mediante un análisis PANTHER (<http://pantherdb.org/>). Destacan, por la cantidad de genes implicados, la “vía de señalización Wnt”, la “vía de señalización de las Integrinas” y la “vía de señalización de la inflamación mediada por citoquinas”, todas ellas implicadas en diversos procesos relacionados con el metabolismo óseo.



**Figura 46.** Gráfico obtenido con la aplicación *PANTHER*, en el que se observan las principales rutas celulares relacionadas con los genes del estudio.

De los genes obtenidos, destacan los 18 que intervienen en la vía Wnt, entre los que se encuentran *CTNNB1* y *TBLIX*, ambos relacionados con osteoporosis y enfermedades relacionadas con hueso, respectivamente (Hsu and Kiel 2012; García-Ibarbia *et al.* 2013). Por otra parte, en la “vía de señalización de las Integrinas” participan un total de 16 genes entre los que están *COL10A1* y *ITGA4*, ambos validados por espectrometría de masas.

Además, como puede observarse en la Figura 46, la ruta de “Inflamación mediada por citoquinas” fue una de las rutas más representadas en el estudio, con 18 genes, entre los que destacan *CCL13*, *RAF1* y *PF4*.

#### 4.2.2.1. Estudio de asociación de SNPs candidatos (*MEF2C*, *CTNNB1*, *FOXC1* y *EBF2*)

Tras la clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente se procedió a la selección de 4 SNPs en cuatro genes diferencialmente expresados con el objetivo de analizar su asociación con fenotipos óseos en la cohorte de mujeres. En la Tabla 36 se pueden observar las frecuencias alélicas, genotípicas y el valor de *P* del EHW. Ninguno de los SNPs tuvo una  $MAF < 0.05$  y todos cumplieron el EHW.

**Tabla 36.** Descripción de los polimorfismos estudiados, sus frecuencias alélicas y genotípicas y el valor *P* del Equilibrio Hardy-Weinberg.

Gen	Genotipo	N (Frecuencia)	Alelo (Frecuencia)	<i>P</i> -valor del EHW
<i>MEF2C</i> rs1366594	AA	219 (0.26)	A (0.51) C (0.49)	0.68
	AC	429 (0.51)		
	CC	198 (0.23)		
<i>CTNNB1</i> rs87939	AA	238 (0.28)	A (0.53) G (0.47)	0.95
	AG	424 (0.5)		
	GG	191 (0.22)		
<i>FOXC1</i> rs2745599	AA	261 (0.3)	A (0.54) G (0.46)	0.20
	AG	413 (0.48)		
	GG	195 (0.22)		
<i>EBF2</i> rs1008974	AA	48 (0.06)	A (0.25) G (0.75)	0.28
	AG	332 (0.39)		
	GG	464 (0.55)		

Al analizar la posible asociación de estos SNPs en este estudio preliminar, ya apreciamos que el SNP rs87939 de *CTNNB1* muestra un valor *P* significativo para la asociación a fenotipos óseos en todas las medidas excepto en DMOe-CF (donde muestra una clara tendencia). La significación estadística para el Valor Z de CL resultó muy evidente ( $P=0.006$ ), de manera que las mujeres con genotipo AA presentan un mejor estado óseo que aquellas de genotipo AG o GG. Todos estos datos apoyan la elección de este gen para estudiar su asociación con DMO (Ma *et al.* 2016), así como con fractura ósea (Haffner-Luntzer *et al.* 2016) y riesgo de osteoporosis (Urano and Inoue 2014b). En el caso de los otros tres polimorfismos, no se apreció asociación en este estudio.

Para profundizar en el análisis, se utilizó el *software* SNPstats para determinar el modelo de herencia de cada SNP seleccionado. En la Tabla 38 se muestran los resultados, donde se puede observar la asociación de los genotipos según el modelo de herencia con el Valor Z de CF y CL. Se decidió tener en cuenta el Valor Z para eliminar la variabilidad introducida por la diferencia de edad entre grupos.

**Tabla 37.** Resultados del análisis ANOVA sin corregir por covariables. Determinación de la asociación de los genotipos a DMOe de cadera y columna.

		DMOe-CF (g/cm <sup>2</sup> )	<i>P</i> -valor	DMOe-CL (g/cm <sup>2</sup> )	<i>P</i> -valor
<b><i>MEF2C</i> rs1366594</b>	AA	0.79 ± 0.13	0.383	0.98 ± 0.15	0.838
	AC	0.78 ± 0.11		0.98 ± 0.15	
	CC	0.79 ± 0.12		0.99 ± 0.15	
<b><i>CTNNB1</i> rs87939</b>	AA	0.80 ± 0.12	<b>0.066</b>	1.01 ± 0.16	<b>0.018</b>
	AG	0.78 ± 0.12		0.98 ± 0.14	
	GG	0.78 ± 0.11		0.97 ± 0.14	
<b><i>FOXC1</i> rs2745599</b>	AA	0.78 ± 0.11	0.234	0.97 ± 0.14	0.105
	AG	0.79 ± 0.12		0.98 ± 0.15	
	GG	0.80 ± 0.11		1.00 ± 0.15	
<b><i>EBF2</i> rs1008974</b>	AA	0.80 ± 0.10	0.401	0.96 ± 0.12	0.377
	AG	0.78 ± 0.11		0.99 ± 0.14	
	GG	0.79 ± 0.12		0.98 ± 0.15	

El SNP rs87939 del gen *CTNNB1* presentó un modelo de herencia dominante asociado al alelo G tanto para cadera como para columna, de manera que el alelo G impone peores valores de masa ósea.

Para el SNP rs1366594 del gen *MEF2C* se apreció una tendencia a la asociación con el Valor Z de Cadera con un modelo de herencia dominante para el alelo C, de manera que las mujeres con genotipo AC o CC presentaron valores de masa ósea menores. De la misma manera, para el SNP rs2745599 del gen *FOXC1* se aprecia una tendencia a la asociación del alelo G a una mejor masa ósea con un modelo de herencia recesivo, si bien en ambos casos podemos hablar únicamente de una tendencia clara, pero no alcanzan la significación estadística.

**Tabla 38** ANOVA con modelos de herencia de los SNPs seleccionados relacionados con el Valor Z de CF y CL.

Gen (SNP)	Genotipo	Valor Z de Cadera (Media ± EE)	Modelo de herencia (P-valor)	Valor Z de columna (Media ± EE)	Modelo de herencia (P-valor)
<b><i>MEF2C</i></b> (rs1366594)	AA	-0.01 ± 0.07	Dominante (0.059)	-0.15 ± 0.09	Dominante (0.59)
	AC-CC	-0.15 ± 0.04		-0.2 ± 0.05	
<b><i>CTNNB1</i></b> (rs87939)	AA	0.03 ± 0.06	Dominante (0.0084)	0.01 ± 0.08	Dominante (0.0053)
	AG-GG	-0.16 ± 0.04		-0.25 ± 0.05	
<b><i>FOXC1</i></b> (rs2745599)	AA-AG	-0.14 ± 0.04	Recesivo (0.087)	-0.22 ± 0.05	Recesivo (0.086)
	GG	-0.01 ± 0.07		-0.05 ± 0.09	
<b><i>EBF2</i></b> (rs1008974)	GG-AG	-0.13 ± 0.03	Recesivo (0.5)	-0.18 ± 0.04	Recesivo (0.14)
	AA	-0.15 ± 0.05		-0.45 ± 0.17	

Los resultados del análisis corregido por covariables se muestran en la Tabla 39. Para realizar este análisis se utilizaron los modelos de herencia predichos por el *software* SNPstats.

Como se aprecia en la Tabla 39, al ajustar por el IMC, el SNP rs1366594 de *MEF2C* se encontró asociado al Valor Z de cadera ( $P=0.021$ ), así como el SNP rs87939 (*CTNNB1*), que se encontró asociado al valor Z, tanto de cadera como de columna ( $P=0.010$  y  $P=0.006$ , respectivamente). Por su parte, los polimorfismos de *FOXC1* y *EBF2* no mostraron asociación tras el ajuste por la covariable IMC, aunque en ambos casos se aprecia una tendencia a ello.

**Tabla 39** Análisis de la Covarianza (ANCOVA). La corrección se llevó a cabo por IMC, considerándose que al usar el valor Z como parámetro, ya se está corrigiendo de manera intrínseca por la edad.

Gen (SNP)	Genotipo	Valor Z de Cadera		Valor Z de Columna	
		Media marginal estimada±EE	P-valor	Media marginal estimada±EE	P-valor
<b>MEF2C</b> (rs1366594)	AA	0.013 ± 0.065	0.021	-0.150 ± 1.253	0.311
	AC + CC	-0.161 ± 0.038		-0.203 ± 1.217	
<b>CTNNB1</b> (rs87939)	AA	0.028 ± 0.960	<b>0.010</b>	0.009 ± 1.273	<b>0.006</b>
	AG + GG	-0.163 ± 0.951		-0.252 ± 1.195	
<b>FOXC1</b> (rs2745599)	AA + AG	-0.138 ± 0.960	0.102	-0.219 ± 1.216	0.108
	GG	-0.015 ± 0.931		-0.061 ± 1.246	
<b>EBF2</b> (rs1008974)	GG + AG	-0.123 ± 0.962	0.589	-0.178 ± 1.225	0.094
	AA	-0.038 ± 0.850		-0.484 ± 1.122	

Se calculó, usando un análisis de regresión logística, el riesgo estimado asociado a cada genotipo de sufrir osteoporosis u osteopenia en la cadera o en la columna (según la definición de la OMS: Valor T<1). La regresión logística binaria se calculó de acuerdo al modelo de herencia corregido por la variable IMC y se tuvo en cuenta el riesgo de padecer osteoporosis u osteopenia (*Odds ratio*), estableciendo un intervalo de confianza de 95%. En la Tabla 40 se observan los resultados del riesgo estimado de sufrir osteoporosis en cadera.

**Tabla 40.** Resultados de la regresión logística en cadera de los SNPs que resultaron significativos. El SNP de EBF2 no fue significativo. Se muestra el genotipo, el valor P, el riesgo (*Odds ratio*) y el intervalo de confianza 95% (95%IC).

	Genotipo	P-valor	Odds ratio	95% IC
<b>MEF2C</b>	AA vs AC/CC	0.079	1.326	0.968-1.817
<b>CTNNB1</b>	AA vs AG/GG	<b>0.008</b>	1.513	1.114-2.053
<b>FOXC1</b>	GG vs AA/AG	0.063	1.363	0.983-1.891

De los SNPs estudiados, sólo el rs87939 de *CTNNB1* presentó un riesgo significativo de osteoporosis u osteopenia en cadera tras la corrección

( $P=0.008$ ). De esta forma, las mujeres con un genotipo AG/GG tienen un riesgo 1.513 veces mayor de padecer osteoporosis u osteopenia en cadera que las de genotipo AA. Por su parte, los SNPs de *MEF2C* y *FOXC1* continuaron mostrando una tendencia, aunque no se obtuvo la significación estadística.

En el caso del estudio en columna, únicamente el SNP de *CTNNA1* resultó significativo, de lo que concluimos que mujeres con un genotipo AG/GG tienen un riesgo 1.535 veces mayor de padecer osteoporosis u osteopenia en columna que las de genotipo AA.

El SNP del gen *EBF2* no resultó significativo en ninguno de los dos análisis (cadera y columna).

### **4.3. Estudios de funcionalidad de las variantes genéticas**

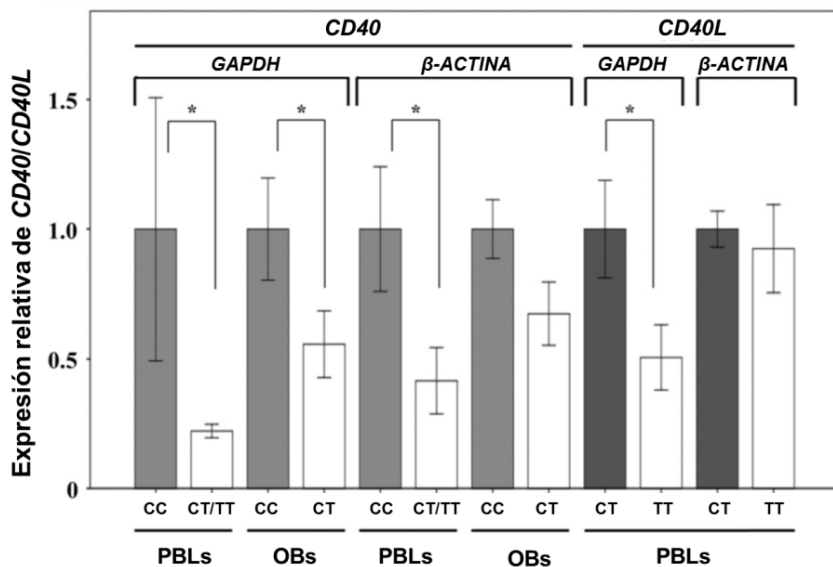
#### **4.3.1. Identificación de una posible expresión génica dependiente de alelo (EGDA): *CD40/CD40L***

Como ya se ha descrito en el apartado 4.1.2, en el presente trabajo se detectó una asociación de varios polimorfismos del sistema *CD40/CD40L* a DMO. Concretamente, esta asociación fue especialmente significativa para los SNPs rs1126535 (*CD40L*) y rs1883832 (*CD40*). Esta asociación genética ya había sido detectada en estudios previos (Pineda *et al.* 2008, 2011), y se corroboró y amplió en el presente estudio (Panach *et al.* 2016).

Con el objetivo de establecer si el SNP sinónimo (Leu/Leu) rs1126535 (T>C) (localizado en el exón 1 del gen *CD40L*) y el SNP rs1883832 (C>T) (localizado en la región 5'-UTR del gen *CD40*) eran variantes funcionales provocando una expresión alélica diferencial, se analizó la expresión génica tanto de *CD40* como de *CD40L* respecto al genotipo para estos dos SNPs mediante PCR cuantitativa. Para ello, se usó tanto a ARN obtenido de osteoblastos primarios humanos, como de leucocitos de sangre periférica (PBLs, *peripheral blood leukocytes*) (Figura 47).

La expresión de *CD40L* no se detectó en osteoblastos (no mostrado) mientras que en PBLs se pudo determinar que las mujeres con el genotipo CT

para el rs1126535 tenían mayor expresión del gen al compararlo con *GAPDH* ( $P=0.039$ ), pero esta significación no se mantenía respecto al gen de la  $\beta$ -*ACTINA* (Figura 47).



**Figura 47.** Expresión génica (media $\pm$ DE) de *CD40* y *CD40L* en osteoblastos primarios y en PBLs, en función del genotipo para el SNP rs1883832 (*CD40*) y el rs1126535 (*CD40L*). La expresión génica se estimó usando la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , siendo  $\Delta Ct$  la diferencia entre las Ct para *CD40* o *CD40L* y la Ct del gen *housekeeping* correspondiente (*GAPDH* o  $\beta$ -*ACTINA*). Los valores se normalizaron respecto a la expresión génica del genotipo CC (en el caso de *CD40*) o CT (*CD40L*). Los tamaños muestrales para *CD40* fueron CC=8 y CT=10 en el experimento usando osteoblastos primarios y de CC=5 y CT/TT=10 para el estudio de PBLs. El tamaño muestral para *CD40L* (PBLs) fue CT=10 y TT=11. \* $P<0.05$ .

Dado que los resultados no aportaban evidencias firmes, y la baja disponibilidad de homocigotos recesivos para ambos SNPs (TT para rs1883832 y CC para rs1126535), se decidió estudiar un posible desequilibrio alélico (*allelic imbalance*) en los heterocigotos, mediante secuenciación (Ge *et al.* 2005), según lo descrito en el apartado 3.7.1.1.

Para esto, se obtuvo ADN genómico (ADNg) y ARN total de PBLs de 18 mujeres heterocigotas para ambos SNPs (cohorte DMO), en condiciones

basales (sin tratamiento). Se retrotranscribieron los ARNs a ADNc según lo descrito previamente (apartado 3.4.1) y se amplificaron las secuencias que contenían ambos SNPs en los cebadores específicos para cada región (Figura 48 y Figura 49).

```
GCCAAAGGCTGGGCGCAGGGGAGTCAGCAGAGGCCCTCGCTCGGGGCCCCAGTGGTCTGCCGCCTGGTCTCACCTCGC ATGGTTCGCTGCCTCTGCAGTGC
GTCCCTTGGGGCTCTTCTGACCGCTGTgagttgttttggcccgcacagacgggagtgggagtggggaatgagaagaaaggaaggaagacttcggg
gaagagcctctctctggctgattttttgggggcaggaggggtgggtgggagctgggcaaggtgccccgcctcctggctgaatggggtgggtgcctctctct
ctccccggcttggggtccgggagcggcctacagggggcctcaggggaaggcactggctgccccagcctcctagacggcctggacgggttttaggagcct
cagaggtggccacacagagactggttagggggtcagagggcgggaagtgagggcggcaaaagggagggggcggtctggcccttctcctgccccctctta
ttgtggacagatgcccgcctctgtaagtattatcatcctctgcccagctggggctgctctctccaggcatctgtgggaacaagagatgggtgcagag
gccccagctctttgtgagaagcgaaggacttttaactcgcctccaccccgaacctatctgggtgttccaacctaggaggaactccccagggctttg
ccttttctcctgaattaaagatgactaggagacccctggggagatgaacagtttatgggacacaataaaaggttaggacaagactctgtgtggct
tgacagggctgggtgacagggcctgagaagaacagggggtttctccaggcaccagaggggctcagagccaaccaagcatactccggatcttccaagaac
tacacttgacacacttttgtttaaagtatttttctgaggtctcctcattctggaggtgggaatccccaaagtccctctcaccagccctctgg
ctccccctacttttagagggctgtgagatctcctgctgaaagcctgggaggaatgacccatggtatcaaggaaagcaagggagcagaagggagagagaggg
agtggggaggtgcttgggtccacagcttccacttcaactgaaagcaatggctcttagggaaacagggagggcaggggagggcgagctggaaagaggttaa
agggggccctctgtgagaggtggagaagagccagagaggggtgggtgagggctgtgacagggctctccaaagcagaggtttgcccctataactccca
actttgctccaggtgagggctggctgtgcaacaactgtccagaactctctatttgaaggctctctgtgtgctcaggtcttgagccaactgctgctgttt
ctttgtgattctcacaactccccattatacagatgggcaaatgaggtccagaaggggagttgtcttgcaaaaggtctcctagctagctaatggaa
gaacctgggtgtgaaatcacactctgatgattcccgagcctgctcctcagatgagaggtctccaagctctggctcagtgcttttggcagaagagc
cagaactagggagtgagaactggagattgacagacttttagggagcgtttatttctcagtggttgaagatggtatcaaggacttctcactcttgg
gaggtgggagctccagctccacagatgggtgcttgcgaatgagcgtggggggcagtagcctttctactccttccccatttgggttaagacacatt
ctgaagtaattgtctgagatacccaggtgtaagtagagccacagtaggtaggattctggacagccagtagccgggctgctgccaataatacat
ccaagcagaacaacaaatgagatgattaaaatggccatttaatgagcacctactatgttctgacactgtgctgagccaataatactatctcttctc
ttcgtatacccactgcaagtcaggcctatttactccccatttagagatagagaaactgaggtcaagagaacaaatagctaatgattggttacaaggtca
ggactggagctctaaagctgctgactctcaaaactgtgtctcttctcactggctgttccaaactgtgggacagttttaaggagcaactggaacatagaat
aacatacacttaactttacagctcttttaaaaaactctctcatttttcaaaagaggaagtctctggagctagaatagagtttaagcctccaaaggctgt
aatctcttttaaaacaaaactcaagagcggcctgggagggcctcaacaagcaaacacagcctgggttttaataaactgtttgttctccccagaat
ttattcttggttaccttttatttagagaaagtgatactgggtcttctctggcaatgagtgaggtttacatttaaaagaaagtcagggcagcca
cggtggctgtgctgtaatccccagcctttgggagccaaagcagctcagatcactgaggtcaggagtttagatcagcctggccaacaggtgaaaccc
tgtctactaaaaatcaataaatagccgggcatagtggtacacacctgtaatcccagctactcaggaggtgaggtggagaatgcttgaacacagga
gataaggtgtagtggtggctgagatgactccactgcaactccagcctgggctgagagcagactctgtctcaaaaaataaaataaaagtatgaaataac
ataagtaataatagctaggggtggtcctggatgtagtaaaatggtgaagatgaaacacaagtgtatggagagagagacatgagacctgagttctcatt
tggactctgtcactgtgagactctggcgaagtacccctcctcttggctcagctcaactctctgtaaaatgaaagtgtgagtttaccctccagctt
acatctagcattttatgaggaaggctggaatgaacagatgtagggaggtggaggaagaaacatgagggcttggaaagagcaggaaggaagcag
aagaataggaagagggcgaagtgtcaaacatagccccaaacagcactgggaccagctgaggtcagccagctcagactccaggggagctgctggagct
ccccatcctatgggactttgggaagaggaatgactcaggcctcaagccccaaaggaatctgtctgtctcagagaatattgtgagtttaacgtaccattg
ctttgtaaaaaatccagaatgattctctgggtgcgattataatcagctcagttgacaatttacttgaaaaacacatgcccataatcagatgctcact
ttctgtttgactgcaactcagttttgagcctcctgctggatgactttaccctttctgctgaaagaggttccaagtagttccaagctccctcaaaatt
gcacaattctgtttttgGTCCATCCAGAACCCCCCTGCATGCAGAGAAAACAGTACCTAATAAACAGTCCAGCTGCTGCTGCTGACCGAGTga
```

**ADN genómico (217pb)**

```
GCAGGGGAGTCAGCAGAGGCCCTCGCTCGGGGCCCCAGTGGTCTGCCGCCTGGTCTCACCTC
GC ATGGTTCGCTGCCTCTGCAGTGCCTCTGGGGCTGCTTGTGCTGACCGCTgtaggtttttggc
ccgaccagacggaggtggaggtggggaatgagaagaaaagggaaggaagacttggggaagagggcctctgctgattttgt
```

**ADN copia (ARN mensajero) (189 pb)**

```
GCAGGGGAGTCAGCAGAGGCCCTCGCTCGGGGCCCCAGTGGTCTGCCGCCTGGTCTCACCTC
GC ATGGTTCGCTGCCTCTGCAGTGCCTCTGGGGCTGCTTGTGCTGACCGCTGCCATCCA
GAACCACCCACTGCATGCAGAGAAAAACAGTACCTAATAAACAGTCACTGCTGCTTGTG
CC
```

**Figura 48.** Fragmento de secuencia flanqueante al polimorfismo rs1883832 del gen *CD40* (señalado en rojo). La secuencia codificante se representa en gris y mayúsculas y en blanco y minúscula, la secuencia correspondiente al intrón. El cebador directo está resaltado en amarillo y es común para ambos amplicones. El cebador reverse es específico en cada amplicón (el correspondiente a ADN genómico se encuentra resaltado en azul y el específico para ADN copia está marcado en verde).



ACCAAACTTCTCCCGATCTCGGGCCACTGGACTGCCCATCAGCATGAAAATTTTTATGTATTTACTTACTGTTTTTCTTATCACCCAG  
ATGATGGGTGAGCACTTTTTGCTGTGTATCTTCATAGAAGGTGGACAAGgtaagatgaaccacaagcctttattaactaaatttggg  
gtccttactaatttcataaggttgggttctaccaaatgatggatgatggtagaaaccaaataagaagaatggcttctgtggcataatgcttgt  
tgccctagtcaatgaagctcacaattcttctgtctcgtttaggatcttgggatctggagtcagactgctctgggttcaaatcttggctctgc  
ccataccatctctgttatctctggggcaagtgccctcagttccacatctgagaaatggggatggtatgggtgccatttcataagattaa  
tgagtttagccttgtaaaaagcttaggaggggctgatacatagtaagcaactatgtacgcactagctataaattatttggctaaagtct  
gctttaaaagtaagctattttttagggagacagctttttcttttaaaatccagactaggcaagaagagcgtcaatttgatcctaaat  
ttcataatgcttcagatlaacatagacatggataagtcaccagaatttgcagctcttttagtaaaagtagcattttctgtgtaattcttca  
caagcactgattgtagtgcaggatgctcagctcctctgagatggtttacatttttaaatggttagacttgcaggaaacaaaagagca  
gagtaacttagtaggctgtttgcatcttaggaaaagaaaacatcaggacttattttgttttcacatgatttttctacttccactgag  
gagataaattggctggttgcacaaaataccaatcatagatgtaaggagaaagttagtagtttctggctgttctctaaaattctgga  
tgcaggaactgtggctagaaagcctctggatgtagcactttagcagggatacttgagtgctctctcttaggatctggacacgaatta  
atgctatgagatttttcaacaggataaagtgaggttagtgagggctgaagctcatccactgggttattccaaatattaggtttcactgctg  
acaaaagagggggtctctggtctggttgggtattttgtgttggcctgagtgctctgtcaatcaaatgtatggacataggcctagcttc  
taaaagggcaatgtagcctcagtgagctgatattaccgtactatttcatgtgctcttaattacagcagaagctgccagctaaactga  
atcttgttttgaatctaaaaatctactctttaaagcaagaaaatggtataaaatagttgataatgcaagtgaaattctgtacattta  
tattctaaagacattggaataaaaatacttctgttactttgaggtataaaagatgatttctttaaataagcaaatggtttctcacaatact  
aaagttaaaagggagagagatgtaattagaactcgttaactgacacattgcaaattaactcttttataaagcactgcatcacaaca  
ctaaaatgaagtgggcaaattagctctgcagaaaactatttctaggctgagttataatgaccaactcatcttagaagcaatgagaa  
tgtgacaattacagaatattgctgctatagattgtgaaaaaatatgcattttgtagtgaacatttagtagaatactgtattctctac  
ctggagtctctgataaacatgacatcttaattgctgtctttatagatttttaaaactgcaaatcaaaaatagcaaatcagcccaataa  
acttatttctccatttatgctgaaagctctctctctgttggatgcccgtgaaatgaaatgtagagagcagatattcattagctgtattct  
ccttccgaatgacatttatcatatccttgttatccaaaatagaTAGAAGATGAAAGGAATCTTCATGAAGATTTTGTATTTCATGAAA  
CGATACAGAGATGCAACACAGGAGAAAGATCCTTATCCTTACTGAACTGTGAGGAGATTAAAAAGCCAGTTTGAAGGCTTTGTGAAG

ADN genómico (225pb)

ACCAAACTTCTCCCGATCTCGGGCCACTGGACTGCCCATCAGCATGAAAATTTTTATGTATTTACTTACTGTTTTTCTT  
ATCACCCAGATGATGGGTGAGCACTTTTTGCTGTGTATCTTCATAGAAGGTGGACAAGgtaagatgaaccacaagcct  
ttattaactaaatttggggtccttactaattcataggttgggttctaccaaatgatggatgatgg

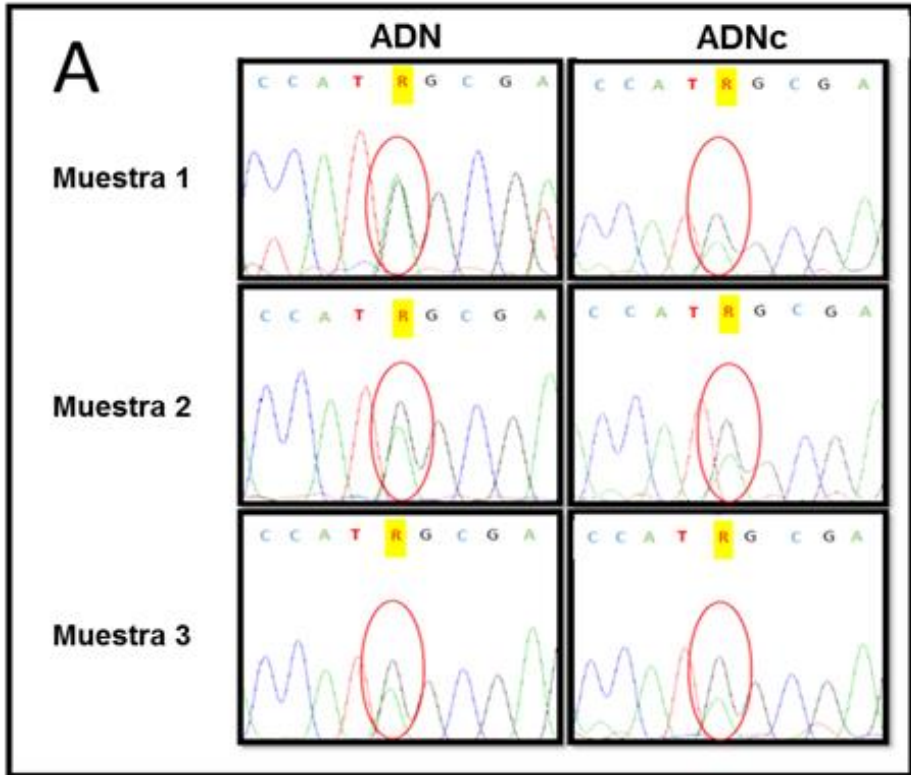
ADN copia (ARN mensajero) (249 pb)

ACCAAACTTCTCCCGATCTCGGGCCACTGGACTGCCCATCAGCATGAAAATTTTTATGTATTTACTTACTGTTTTTCTT  
ATCACCCAGATGATGGGTGAGCACTTTTTGCTGTGTATCTTCATAGAAGGTGGACAAGTAGAAGATGAAAGGAATCTTCATGAAGATTTTGTATTTCATGAAA  
GATTAAAAAG

**Figura 49** Fragmento de secuencia flanqueante al polimorfismo rs1126535 del gen *CD40L* (señalado en rojo). La secuencia codificante se representa en gris y mayúsculas y en blanco y minúscula, la secuencia correspondiente al intrón. El cebador directo está resaltado en amarillo y es común para ambos amplicones. El cebador reverse es específico en cada amplicón (el correspondiente a ADN genómico se encuentra resaltado en azul y el específico para ADN copia está marcado en verde).

Una vez amplificadas las muestras, se secuenciaron los fragmentos y se obtuvieron los electroferogramas de cada muestra. A continuación, se analizaron las alturas de los picos gracias al *software* PeakPicker, según lo descrito en 3.7.1.1. El desequilibrio alélico se definió usando el test específico de muestra, de manera que si más del 80% de los heterocigotos individuales muestran sobreexpresión del alelo dominante en el ADNc con respecto al ADNg se concluye que existe desequilibrio alélico (Ge *et al.* 2005).

Las Figura 50 y Figura 51 muestran los electroferogramas representativos del análisis del desequilibrio alélico para los alelos C/T de los SNPs rs1883832 y rs1126535 de *CD40* y *CD40L*, respectivamente.

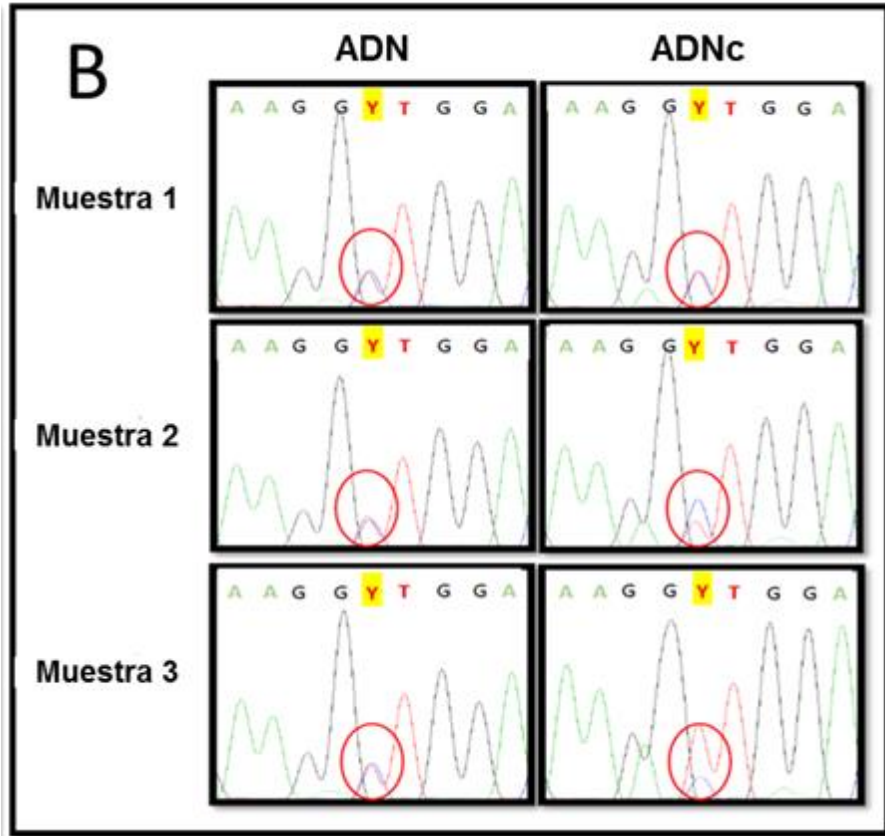


**Figura 50.** Electroferogramas representativos de tres muestras del análisis de desequilibrio alélico basado en la secuencia para los alelos C/T del SNP rs1883832 en la secuencia reversa de *CD40*. Cada fila representa un análisis de expresión alélica de una muestra heterocigota, mostrando la secuencia del ADNc obtenido a partir de ARN y su referencia de ratio alélico 50:50 de ADN genómico.

Como se puede observar, el alelo ancestral C está representado en mayor medida que el alelo T para el SNP rs1883832 del gen *CD40* (Figura 50). Se estimó el desequilibrio alélico usando un test específico de muestra (AI95), que considera que si  $>80\%$  de las muestras de ADNc están fuera del intervalo de confianza al 95%, calculado a partir de muestras heterocigotas

independientes de ADN genómico, existe desequilibrio alélico (Ge *et al.* 2005).

Para el SNP rs1126535 del gen *CD40L*, no se detectó un desequilibrio entre alelos al comparar los electroferogramas entre ADNc y el ADN genómico (Figura 51). En consecuencia, no se realizaron más estudios con este SNP.



**Figura 51.** Electroferogramas representativos de tres muestras del análisis de desequilibrio alélico basado en la secuencia para los alelos C/T del SNP rs1126535 en la secuencia directa de *CD40L*. Cada fila representa un análisis de expresión alélica de una muestra heterocigota, mostrando la secuencia del ADNc obtenido a partir de ARN y su referencia de ratio alélico 50:50 de ADN genómico.

### 4.3.2. Caracterización de la tasa de transcripción mediante ensayos de gen reportero

Los SNPs que se encuentran situados en el promotor de un gen, pueden afectar a la expresión del mismo, por ejemplo, al modificar la secuencia consenso de unión de un factor de transcripción. Con el objetivo de estudiar la posible EGDA se realizó un ensayo de gen reportero en SNPs que previamente se había comprobado que se encuentran asociados a DMO. Los tres SNPs estudiados fueron: el rs7771980 (T>C) de *RUNX2*, el rs1428922 (G>A) de *CD79A* y los SNPs rs1800686 (G>A) y rs752118 (C>T) de *CD40*.

#### 4.3.2.1. *RUNX2*

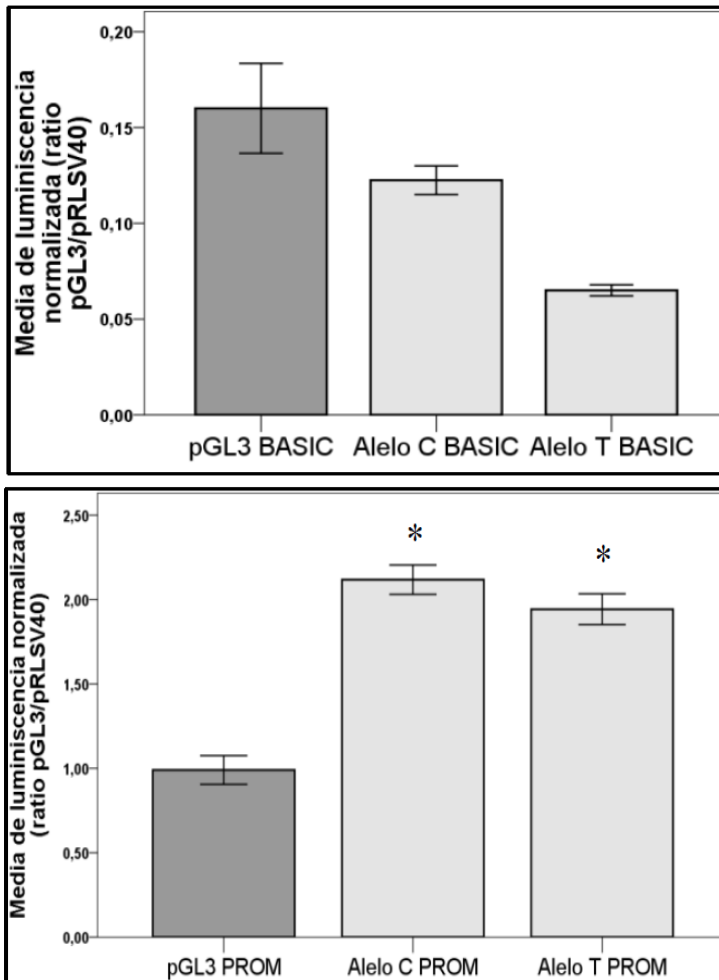
El gen *RUNX2* codifica para un factor de transcripción clave en la diferenciación de los OBs. En estudios anteriores de este grupo (Pineda *et al.* 2010) se demostró la asociación del SNP rs7771980 (T>C), situado en la región reguladora del promotor 2 (P2) en la posición -1025, con la DMO, por lo que se decidió estudiar su posible funcionalidad.

En la Figura 52 se observan los resultados de luminiscencia obtenidos para esta región de *RUNX2*. La actividad de la enzima luciferasa del vector pGL3 se normaliza frente a la luciferasa del vector pRLSV40 tal como se ha comentado en el apartado 3.7.1.3. En este caso se clonó el fragmento que contenía el SNP en los vectores pGL3-Basic y pGL3-Promoter, ya que este fragmento podría contener secuencias reguladoras.

En el caso de las construcciones clonadas en pGL3-Basic se observa una disminución de la expresión génica que no es significativa. En las construcciones clonadas en pGL3-Promoter aparece una mayor actividad luciferasa en la construcción que contenía el alelo C (poco frecuente) frente al alelo T (común).

Para las construcciones clonadas en pGL3-Promoter, la realización de un test ANOVA seguido del análisis *post-hoc* de Bonferroni mostró un aumento significativo en la expresión de ambos alelos frente al vector vacío ( $P < 10^{-5}$  en ambos casos).

La Figura 52 muestra los resultados de este estudio. La expresión de ambos alelos respecto al vector vacío en el caso de pGL3-Basic no fue significativa, lo que sugiere que este fragmento no contiene ninguna secuencia promotora que aumente la expresión génica.



**Figura 52** Expresión de luminiscencia de luciferasa normalizada frente a la luminiscencia de pRLSV40 (media±EE) para el SNP rs7771980 (T>C) de *RUNX2*. (\*:  $P < 10^{-5}$  (p.h. Bonferroni)).

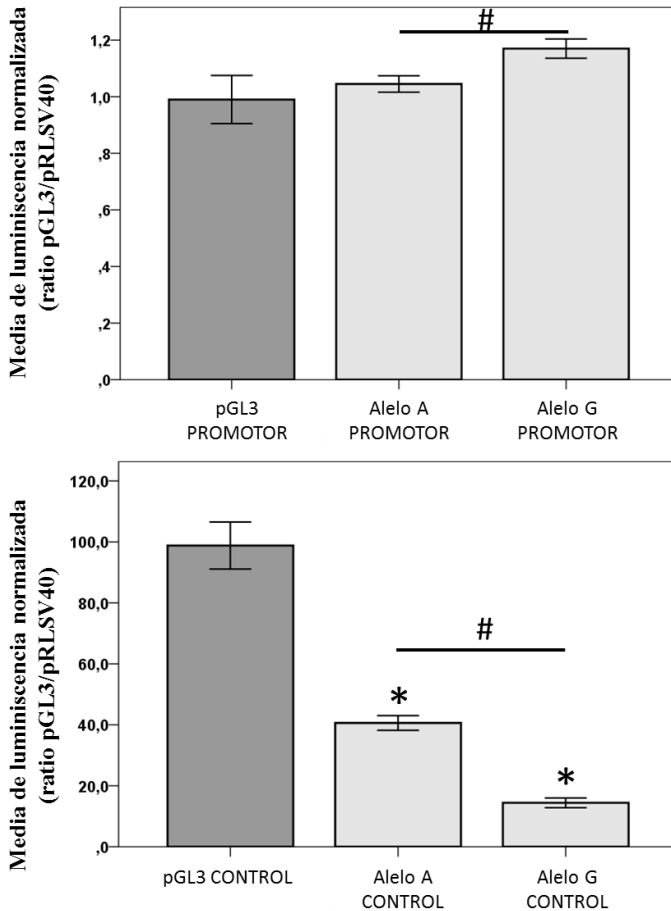
#### 4.3.2.2. *CD79A*

El gen *CD79A* codifica para una de las dos cadenas que forman la proteína transmembrana CD79. Ésta interacciona con el receptor del linfocito B (BCR), que es el que desencadena la señal de activación de las células B (Seda and Mraz 2014). En el estudio traslacional a partir del modelo de ratona ovariectomizada comentado previamente, en que se analizó los genes diferencialmente expresados en médula ósea total, se observó la asociación del SNP rs1428922 (G>A), en posición -1410 del gen *CD79A* con respecto a DMO, por lo que se decidió comprobar su posible funcionalidad clonando la región adyacente al polimorfismo según lo descrito en el apartado 3.7.1.3.

En la Figura 53 se pueden observar los resultados obtenidos para el gen *CD79A*. En este caso, debido a resultados previos, se dispuso de indicios de que el SNP podría estar localizado en la secuencia de algún regulador negativo de la expresión génica, por lo que se decidió clonarlo en el vector pGL3-Control además de en el vector pGL3-Promoter.

Respecto a las construcciones clonadas en pGL3-Promoter, se observó un aumento significativo ( $P=0.004$ ) en la expresión del alelo G respecto al alelo A. En cuanto a las construcciones clonadas en pGL3-Control existe una mayor expresión para el alelo A (común) frente al alelo G (poco frecuente) ( $P=0.009$ ), y en ambos casos es significativamente menor que la expresión del vector vacío.

El estudio del SNP de *CD79A* reveló que este fragmento de ADN clonado en el vector en pGL3-Promoter apenas varía su expresión, sin embargo, cuando es clonado en pGL3-Control provoca una disminución de la expresión respecto al vector vacío ( $P=0.003$ ) para ambos alelos, que es más acentuada en el caso del alelo G.



**Figura 53.** Expresión de luminiscencia de luciferasa normalizada frente a la luminiscencia de pRLSV40 (media±EE) para el SNP el rs1428922 (G>A) de CD79A. (\*:  $P < 0.01$  frente al vector vacío; #:  $P < 0.01$  entre alelos (p.h: T3 Dunnett)).

#### 4.3.2.3. CD40

El gen *CD40* codifica un receptor esencial en las células presentadoras de antígeno. En este caso se estudiaron los efectos sobre la tasa de transcripción *in vitro* que podrían tener los SNPs rs1800686 (G/A) y rs752118 (C/T), ambos localizados en la región 5' del gen *CD40*.

Para ello se clonó una región de 463 pb del extremo 5' del gen *CD40* que contenía cada uno de los dos haplotipos para los SNPs mencionados (G-C o A-T) en el vector pGL3-promoter (Figura 54). Posteriormente se transfectoron junto con los controles (vectores pGL3-Basic y pGL3-Promoter intactos, además del plásmido pRLSV40, co-transfectado para normalizar la luminiscencia) en células Saos-2 y HeLa según lo descrito en el apartado 3.7.1.3.

```

GGATGGAATGGAATGAGGTGAGGACGCATGGATGCATGGATGAATGGATGGGAAGTTGAGACGACGCG
CCCACACAGGGGAATTTCTTTGAAAGAGAGCGAAATTCGAGTTGGGAAACTCTTCCTTGAAAACGCTC
CCCATACCCAGCTGTGGCCTTCCCGTTTCTGCGTGGTGGTGTGGGGGAACTTCTCAGGCCTCTCC
GCAGTGGAGCCTCTTTCGGTTCTGCCAGGATACCTAGAGGCAGCGGAGAGCGGGGAGGGGAGGGGAAA
ACCGTGAGGGTCCCTGTGGCAGGCCCCAGCACCATGGGATCTCTCTCCGGTCCGAGGAAGCAGGCTA
GCTCCTAGCCCGCCTCGGCTTGGCCTTTGTGGACCTGGGGGCAAAGAAGAAGAGCTGTCTCTGGGAC
CATGCTCCTCCCGTACACAGCAAGATGCGTCCCTAAACTCCCGGGGAATTA

```

**Figura 54.** Secuencia de la región promotora del gen *CD40*. En verde se muestra el lugar en que se encuentra el SNP rs1800686 y en azul el SNP rs752118. En amarillo están señalados los cebadores a los que se añadió la secuencia de la enzima de restricción (SacI o XhoI, respectivamente) y una cola poli-A.

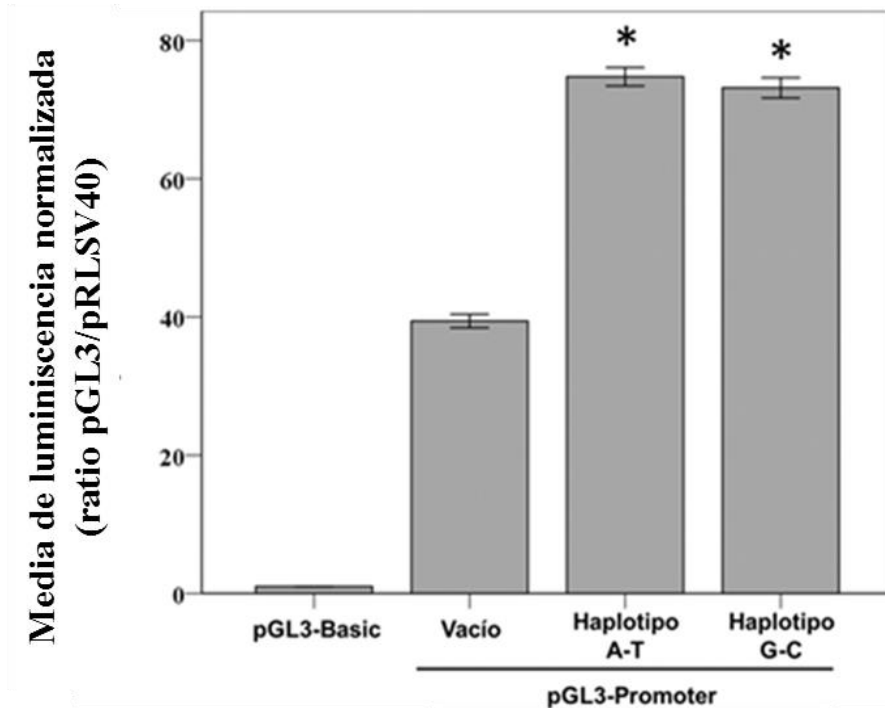
Cuando transcurrieron 48 horas de cultivo tras la transfección, se determinaron los valores de luminiscencia y éstos se normalizaron frente a los valores de actividad luciferasa del vector PRLSV40 de *Renilla reniformis*. Los resultados de la transfección de las células Saos-2 se muestran en la Figura 55.

La expresión de luciferasa para todos los vectores transfectados se refirió al vector pGL3-Basic, que muestra una transcripción basal porque carece de promotor activo, y al vector pGL3-Promoter vacío que representaba la tasa de transcripción para un promotor activo sin elementos reguladores adicionales.

Las construcciones que contenían ambos haplotipos (G-C o A-T) en el vector pGL3-Promoter mostraron el doble de tasa de transcripción que el vector pGL3-Promoter vacío. Los resultados están de acuerdo con el hecho de que se clonó un fragmento con algún elemento en *cis* que incrementa la tasa de transcripción del gen de la luciferasa, aunque no se hallaron diferencias entre ambos haplotipos (alelos) respecto a la actividad luciferasa.



Estos resultados fueron idénticos al transfectar estas mismas construcciones en células HeLa (resultados no mostrados).



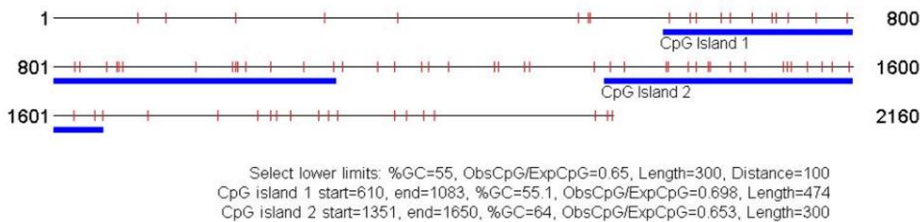
**Figura 55.** Expresión de luminiscencia de luciferasa normalizada frente a la luminiscencia de pRLSV40 (media $\pm$ EE) en células Saos-2 para los SNPs rs1800686 (G/A) y rs752118 (C/T). Las barras para pGL3-basic y pGL3-promoter representan al valor de luminiscencia para ambos vectores vacíos. (\*:  $P < 10^{-6}$ ) (p.h: T3 Dunnett).

#### 4.3.3. Cuantificación del grado de metilación de islas CpG en la región promotora del gen *CD40*

Se había detectado previamente una expresión génica diferencial (alelo-dependiente) para el gen *CD40* (ver 4.3.1). Sin embargo, se demostró que esta expresión alélica diferencial no era explicada por elementos actuando en *trans*, es decir, por unión diferencial alelo-dependiente de factores de transcripción, como se ha demostrado en el experimento de clonación en los vectores pGL3. Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que alrededor del

SNP rs1883832 del gen *CD40*, existiesen elementos actuando en *cis* que pudiesen explicarla.

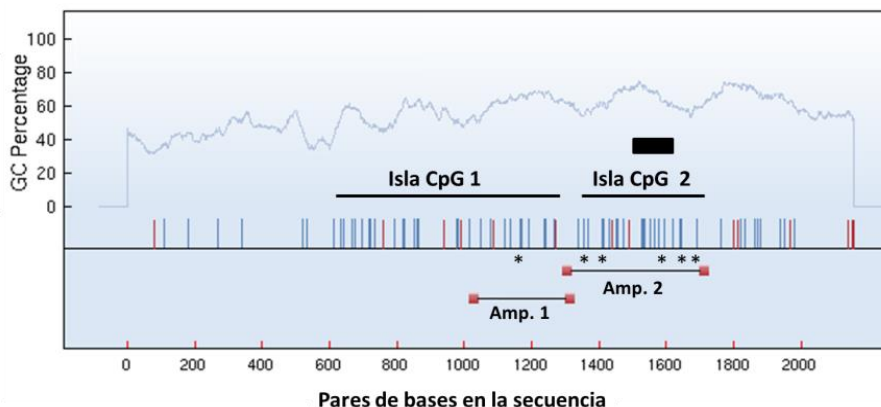
Ya que existen distintos mecanismos epigenéticos actuando en *cis* que pueden regular la expresión génica, se decidió estudiar e identificar posibles islas CpG en la región reguladora de *CD40*. Para ello se usó el *software CpG Island Searcher* (<http://cpgislands.usc.edu/>) que detectó dos islas CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción del gen *CD40* (Figura 56).



**Figura 56.** Captura de la pantalla del *software* de búsqueda de islas CpG, *CpG Island Searcher*. El programa detectó dos islas CpG: la primera de la posición 616-1277 y la segunda de 1341-1695.

La intención inicial fue comparar el grado de metilación en estas islas CpG entre mujeres con genotipos TT (baja masa ósea) y CC/CT (alta masa ósea) para el SNP rs1883832 del gen *CD40*. Sin embargo, dada la falta de mujeres con genotipo TT, se decidió analizar el grado de metilación en estas islas CpG en función de la DMOe, dividiendo a las mujeres en un grupo de alta y otro de baja masa ósea, dado que el genotipo TT se había asociado a un menor nivel de DMOe en trabajos previos (Pineda *et al.* 2008, 2011).

En el gen *CD40*, hay dos islas CpG (CpG1 y CpG2) y en este estudio se cuantificó el grado de metilación de las CpG en dos amplicones solapantes que cubrían la totalidad de la isla 2 y el 40% de la CpG1 (Figura 57).



**Figura 57.** Distribución y porcentaje de CpGs de la región adyacente al lugar de inicio de la transcripción del gen *CD40*. La secuencia de 2160 pb contiene 1488 pb previas al primer exón del gen, 135 pb del exón 1 (rectángulo negro), y 537 pb del primer intrón. Cada barra vertical representa un sitio CpG. Se pueden observar las dos islas CpG detectadas por el *software* Epidesigner y los dos amplicones analizados usando Sequenom. La localización relativa de las islas CpG respecto a la posición ATG fue la siguiente: CpG 1 (−957 a −296 nt) y CpG 2 (−232 a +123 nt). La posición relativa de los amplicones respecto a la posición ATG: amplicón 1 (−555 a −246 nt), conteniendo 12 sitios CpG y amplicón 2 (−280 a +152 nt), conteniendo 22 sitios CpG.

Los datos relativos a la metilación se analizaron individualmente para cada sitio CpG, excepto en los casos en que los sitios CpG estuvieron muy próximos entre sí. En esos casos, dos o incluso tres sitios CpG se analizaron de forma conjunta (CpG1-9.10, CpG2-4.5, CpG2-8.9, CpG2-12.13.14). El valor  $\beta$  emitido por el *software* (0-1) indica el porcentaje de metilación de la muestra original.

Las características antropométricas, bioquímicas, óseas y de tipo de menopausia de las 60 mujeres seleccionadas se muestran en la Tabla 41. Como era de esperar, el grupo de mujeres de alta DMOe mostró un mayor peso corporal, si bien las diferencias en edad, altura, IMC y porcentaje de menopausia quirúrgica no fueron significativas.

Aunque el número de mujeres TT era el mismo en cada grupo, en el grupo de alta DMOe hubo más mujeres con genotipo CC.

**Tabla 41.** Características antropométricas y óseas de las mujeres seleccionadas con alta y baja DMOe para los experimentos de metilación (media±DE).

	Alta DMOe (N = 30)	Baja DMOe (N = 30)	P-valor
Edad (años)	52 ± 4.4	53.3 ± 3.9	0.239
Peso (kg)	69.0 ± 10.3	63.9 ± 8.1	<b>0.038</b>
Altura (cm)	158.9 ± 6.9	156.0 ± 4.3	0.060
Menopausia quirúrgica (%)	20.0	23.3	1.000
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.4 ± 3.9	26.3 ± 3.5	0.255
OPG (pg/ml)	102.4 ± 28.8	91.9 ± 24.3	0.273
Genotipo rs1883832 (TT-CT-CC)	3-11-16	3-20-7	<b>0.047</b>
DMOe- CF (g/cm <sup>2</sup> )	0.949 ± 0.111	0.690 ± 0.054	< <b>0.000</b>
CF Valor Z	1.145 ± 0.986	- 1.005 ± 0.468	< <b>0.000</b>
DMOe- CL(g/cm <sup>2</sup> )	1.178 ± 0.100	0.805 ± 0.049	< <b>0.000</b>
CL Valor Z	1.327 ± 0.982	- 1.642 ± 0.380	< <b>0.000</b>

La Tabla 42 muestra la cuantificación de la metilación de ADN de los sitios CpG para los dos amplicones analizados. El amplicón 1 contiene 12 CpGs mientras que el amplicón 2 contiene 22. Algunas de las CpGs, sin embargo, no fueron detectadas por el sistema. Otras, dada la proximidad con las CpGs vecinas, aparecieron como dobletes o tripletes, con lo que finalmente sólo aparecen 20 CpGs en la Tabla 42.

El modelo de análisis multivariante ajustado por las covariables edad, peso, altura y menopausia quirúrgica, confirmó que 8 de las 20 CpGs analizadas (40%) mostraban valores de metilación de ADN estadísticamente significativos entre mujeres de alta y baja DMO (Valor *P* ajustado). Cuando se ajustó por el test FDR en el modelo multivariante, sólo 6 de las 20 (30%) permanecieron como significativas (*Q*-valor ajustado). Como dato interesante destacar que los sitios CpG tendían a estar más metilados en mujeres con baja DMO (Tabla 42).

**Tabla 42.** Valores de metilación en PBLs, para los sitios CpGs analizados en el promotor de *CD40* en mujeres de alta vs baja DMOe (en %; medias marginales estimadas  $\pm$ DE).

Sitio CpG <sup>a</sup>	Posición (pb) <sup>b</sup>	Alta DMOe (N = 30)	Baja DMOe (N = 30)	P-valor <sup>c</sup>	Q-valor <sup>d</sup>	P-valor ajustado <sup>e</sup>	Q-valor ajustado <sup>f</sup>
CpG 1-1	- 523	4.8 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 0.6	0.156	0.224	0.189	0.270
CpG 1-4	- 449	1.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.4	<b>0.049</b>	0.141	<b>0.042</b>	0.105
CpG 1-5	- 432	4.4 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.4	0.781	0.781	0.777	0.812
CpG 1-6	- 405	45.1 $\pm$ 2.4	33.9 $\pm$ 2.4	<b>0.00045</b>	<b>0.0018</b>	<b>0.0013</b>	<b>0.004</b>
CpG 1-7	- 398	3.2 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.3	0.671	0.706	0.734	0.812
CpG 1-8	- 378	3.8 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.3	0.079	0.172	0.092	0.165
CpG1-9.10	-332	10.4 $\pm$ 0.9	9.5 $\pm$ 0.9	0.289	0.361	0.541	0.636
CpG 2-1	- 232	1.3 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.114	0.193	0.076	0.162
CpG 2-2	- 216	1.0 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.3	<b>&lt; 0.000</b>	<b>&lt; .000</b>	<b>&lt; 0.000</b>	<b>&lt; 0.000</b>
CpG 2-3	- 202	4.6 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.5	0.452	0.532	0.514	0.636
CpG 2-4.5	- 160	61.5 $\pm$ 2.9	86.9 $\pm$ 2.9	<b>&lt; 0.000</b>	<b>&lt; .000</b>	<b>&lt; 0.000</b>	<b>&lt; 0.000</b>
CpG 2-8.9	- 118	5.2 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 0.7	0.125	0.193	0.151	0.232
CpG2-12.13.14	- 43	5.8 $\pm$ 0.5	67 $\pm$ 0.5	0.258	0.344	0.258	0.344
CpG 2-15	-19	6.3 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.4	0.617	0.686	0.812	0.812
CpG 2-16	- 4	3.8 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.2	0.065	0.162	<b>0.011</b>	<b>0.031</b>
CpG 2-17	+ 7	6.3 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.4	<b>0.006</b>	<b>0.019</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.003</b>
CpG 2-19	+ 48	4.1 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.5	0.086	0.172	0.099	0.165
CpG 2-20	+ 69	1.1 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.4	<b>0.00019</b>	<b>0.001</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.002</b>
CpG 2-21	+ 77	58.5 $\pm$ 1.9	63.2 $\pm$ 1.9	0.125	0.193	0.081	0.162
CpG 2-22	+ 122	21.3 $\pm$ 2.1	32.9 $\pm$ 2.1	<b>0.00016</b>	<b>0.001</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.002</b>

<sup>a</sup> CpG1 y CpG2 muestran los sitios CpG localizados en los amplicones 1 y 2 respectivamente. Los números indican el número de cada sitio CpG. En general, se muestran los valores para



#### **4.4. Papel del sistema CD40/CD40L en la producción de OPG**

##### **4.4.1. Estudios en modelo animal**

###### **✓ Estudio *in vivo***

Se había descrito previamente que estimular CD40 por medio de un anticuerpo activador o de la proteína CD40L recombinante inducía la síntesis de OPG tanto en médula ósea total como en células B de médula ósea y amígdala (Yun *et al.* 1998; Li *et al.* 2007a).

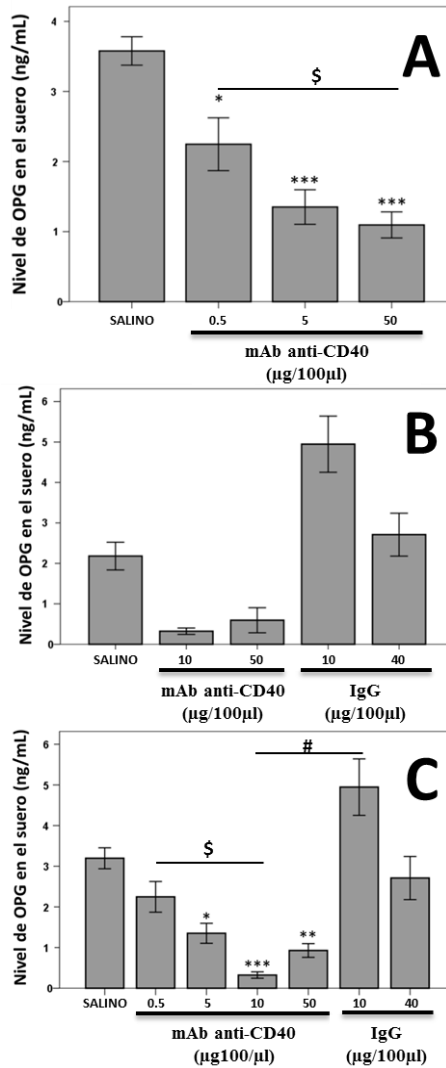
Con el fin de comprobar este efecto de la activación de CD40 sobre el nivel de OPG, así como esclarecer el mecanismo de acción de este proceso, se decidió administrar intraperitonealmente un anticuerpo activador de CD40 y determinar el efecto sobre el nivel sérico de OPG tal y como se describe el experimento en dos fases descrito en el apartado 3.7.3.1.

En el primer estudio se compararon varias dosis de anticuerpo anti-CD40 usando como control negativo la administración de suero salino ya que es el vehículo en el que está resuspendido el anticuerpo. En el segundo experimento se añadió además, como control negativo, la administración de un control isotópico a dos dosis diferentes según lo descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 59.

Como se puede observar en el primer experimento con ratonas (Figura 59A), la administración de anti-CD40 activador, produce una disminución significativa de OPG en todos los casos y dosis dependiente. Así, la figura muestra una disminución significativa del nivel de OPG en las ratonas tratadas con anti-CD40 a dosis 0.5 µg/100µl ( $P=0.008$ ), a dosis 5 µg/100µl ( $P=1.2 \times 10^{-5}$ ) y a dosis 50 µg/100µl ( $P=1.9 \times 10^{-6}$ ), con respecto a las tratadas con salino. Además, existe una diferencia significativa entre las dosis 0.5 µg/100µl y 50 µg/100µl ( $P=0.027$ ).

En el segundo experimento con ratonas, además de salino, se administró un control isotópico IgG2k (Figura 59B). Como se refleja en la figura, se produjo de nuevo una disminución del nivel de OPG en las ratonas tratadas

con anti-CD40 a todas las dosis, si bien en esta ocasión, esta disminución no resultó significativa en ningún caso.



**Figura 59.** Nivel de OPG sérico en ratonas inyectadas con administración IP del anticuerpo activador de CD40 o control **A)** Resultados del primer experimento ratonas(n=32 ratonas) **B)** Resultados de la segunda tanda de ratonas (n=19) **C)** Resultados de ambas tandas de ratonas (n=51) tomadas en conjunto. (Corrección p.h: Bonferroni asumiendo varianzas iguales, T3 de Dunnett asumiendo varianzas diferentes).

\*=P<0.01, \*\*=P<0.0001, \*\*\*=P<10<sup>-5</sup>, frente a salino

§; #=P<0.05



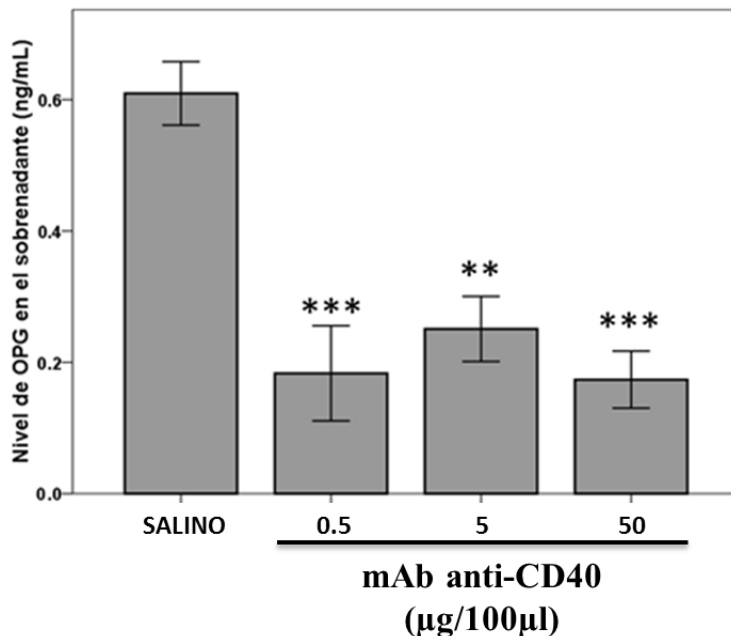
Dado que ambos experimentos se diseñaron y ejecutaron de igual forma, con el objetivo de aumentar el tamaño muestral y con ello el poder estadístico, se decidió analizar conjuntamente ambos experimentos (Figura 59C). Como se puede observar, se aprecia una disminución significativa del nivel de OPG en las ratonas tratadas con anti-CD40 a dosis 5  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  ( $P=0.002$ ), 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  ( $P= 4.6 \times 10^{-6}$ ) y 50  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  ( $P=1.8 \times 10^{-5}$ ), con respecto a las tratadas con salino. Por otra parte, detectamos una diferencia significativa entre las dosis 0.5  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de anti-CD40 ( $P=0.018$ ), así como entre las dosis de 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de anti-CD40 y la dosis 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de control isotópico IgG2k ( $P=0.047$ ).

#### ✓ **Estudio *in vitro***

Con el objetivo de comprobar si el efecto de la administración de un anti-CD40 sobre los niveles séricos de OPG se mantiene *in vitro*, se aislaron distintos tipos celulares de las ratonas y se cultivaron durante 6 días para recoger el medio condicionado. En concreto se aislaron células de médula ósea total (MO), de bazo y linfocitos B CD19<sup>+</sup> inmunopurificados a partir de MO total y se cultivaron según se describe en el apartado 3.7.3.1. Los resultados se muestran en la Figura 60.

Como se puede observar, las células de la MO total siguen produciendo OPG *in vitro* y esta producción disminuye también de acuerdo a la dosis de anti-CD40 administrada a la ratona del cual provienen. Efectivamente, el test ANOVA (*post-hoc* de Bonferroni), confirmó que el efecto de la administración IP del anticuerpo era mantenido en estas células al ser cultivadas *in vitro*, obteniéndose un valor  $P$  significativo a todas las dosis.

En los cultivos de bazo, así como los de linfocitos B CD19<sup>+</sup> aislados a partir de MO total, no se detectó presencia de OPG en el sobrenadante (datos no mostrados).



**Figura 60.** Nivel de OPG en el sobrenadante de células de MO total en cultivo, obtenidas a partir de fémures de ratonas previamente tratadas con anti-CD40. (p.h: Bonferroni).

\*\*=  $P < 0.01$ ; \*\*\*=  $P < 0.001$  con respecto a salino.

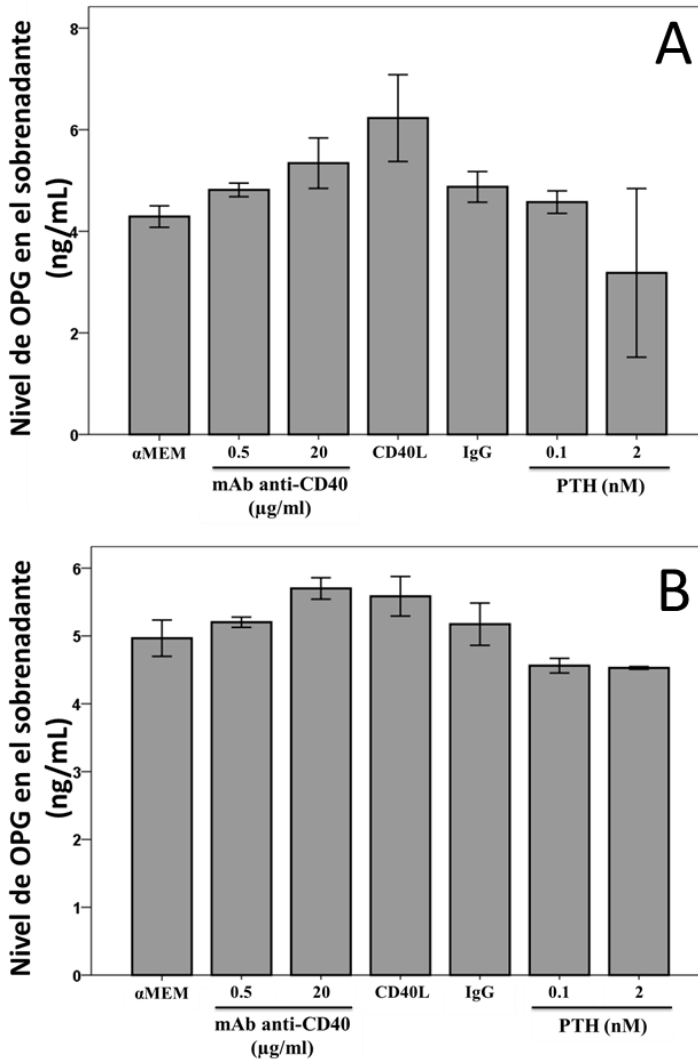
#### 4.4.2. Estudios en modelos celulares

##### ✓ Estudio en pre-osteoblastos

Dado que no se detectó OPG en sobrenadantes de cultivos de células de bazo ni de linfocitos B CD19<sup>+</sup> obtenidos de MO total, se decidió evaluar la producción de OPG en una línea pre-osteoblástica de ratón (MC3T3-E1), tanto en la fase de proliferación como en la de diferenciación, en presencia y ausencia de medio osteoblastogénico (MOG; ver 3.3.1). Los resultados para los cultivos sin MOG de este experimento se muestran en la Figura 61.

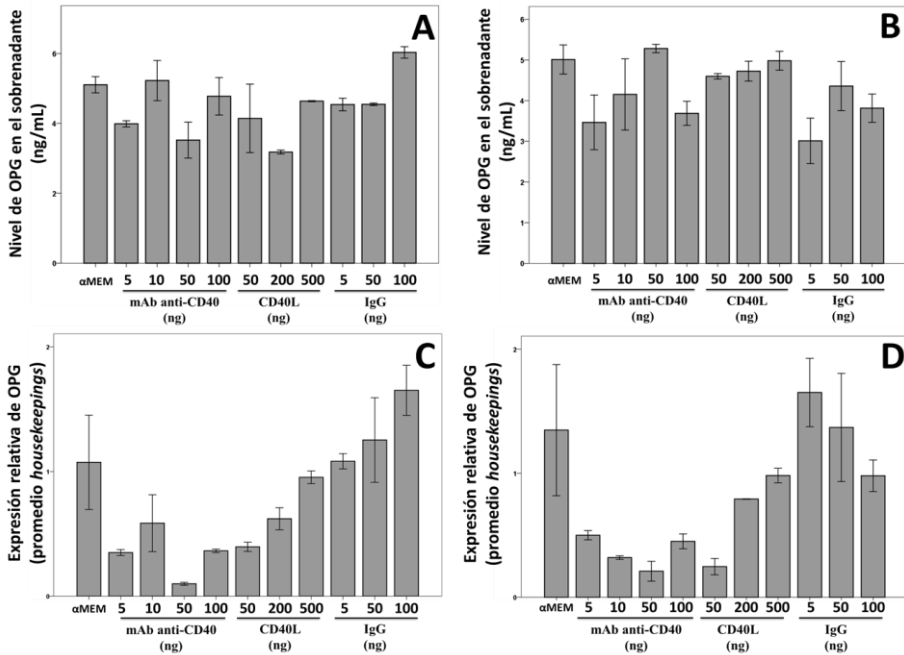
Como se puede observar, el experimento cuyos resultados se muestran en la Figura 61 demuestra que las células MC3T3-E1 producen OPG, si bien no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Además, la tasa de producción de OPG tampoco parece depender del estado celular (proliferativo/diferenciado) ni de la adición de inductores de la diferenciación osteoblástica (resultados no mostrados).



**Figura 61.** Producción de OPG (ng/ml) por las células MC3T3-E1 en proliferación (A) y confluencia (B) a tiempo final (6 días). (La proteína trimérica CD40L se dispuso a la concentración de 500ng/ml y el control isotípico IgG2k a 20 $\mu$ g/ml).

Para establecer el efecto de la estimulación de CD40 con mayor número de dosis de anticuerpo anti-CD40, pero también para determinar el efecto de la administración de CD40L recombinante y de la administración de un control isotípico, se realizó un experimento en células confluentes, tanto en presencia como en ausencia de MOG. Los detalles del ensayo y los resultados se muestran en la Figura 62.



**Figura 62.** Efecto de los tratamientos sobre la producción de OPG por células MC3T3-E1 en confluencia. En la mitad superior de la imagen se muestra el nivel de OPG en sobrenadante de cultivos medido por ELISA sin MOG (A) y con MOG (B). En la mitad inferior se muestra la expresión génica relativa de OPG en las mismas condiciones, sin MOG (C) y con MOG (D). (Los tratamientos están expresados en ng/ml cultivo).

De nuevo, cuando se determinó la OPG mediante ELISA en el medio condicionado, no hubo diferencias entre tratamientos ni debido a la adición de MOG. Estos resultados, y los anteriores, sugieren una expresión constitutiva de OPG en esta línea de células. Cuando se determinó el nivel de expresión génica de OPG, aunque se aprecian niveles más dispares (Figura 61, C y D),

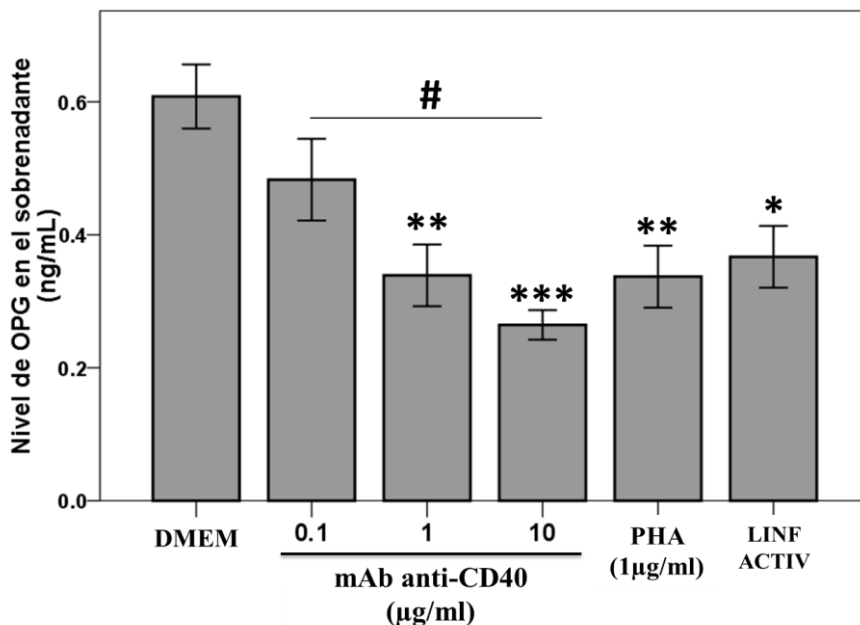
no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ni tendencias claras. Además, cabe destacar la enorme variabilidad de este ensayo, que impide extraer conclusiones del todo fiables.

✓ **Producción de OPG por células de médula ósea total, bazo y linfocitos B CD19<sup>+</sup>**

Con el objetivo de comprobar si la producción de OPG en células de médula ósea se ve alterada por la administración de estímulos externos, y si puede inducirse la producción de OPG en bazo y linfocitos B CD19<sup>+</sup> inmunopurificados de médula ósea, se decidió realizar un experimento *in vitro* en estos tipos celulares.

En un estudio piloto realizado previamente se analizó el efecto de la adición del anticuerpo anti-CD40 a células de MO total y Bazo, así como la administración de fitohemaglutinina (PHA) y de linfocitos de bazo activados, tal y como se describe en el apartado 3.7.3.2. Los resultados se muestran en la Figura 63.

Como se puede observar, todas las condiciones reducen la producción de OPG respecto al nivel basal, y en el caso del anticuerpo anti-CD40 esta disminución se produce de manera dependiente de dosis. La adición de PHA, un activador y mitógeno de células T, disminuyó significativamente la producción de OPG en los cultivos de médula ósea. En el caso de los cultivos de linfocitos procedentes de bazo, no hubo producción de OPG (datos no mostrados), lo que refuerza los datos obtenidos anteriormente.



**Figura 63.** Nivel de OPG en cultivos de MO total tras la estimulación con anticuerpo anti-CD40, PHA y co-cultivo con linfocitos activados de bazo (LINF. ACTIV) (p.h: Bonferoni).

\*= $P < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $P < 0.001$  frente a DMEM

#= $P < 0.05$

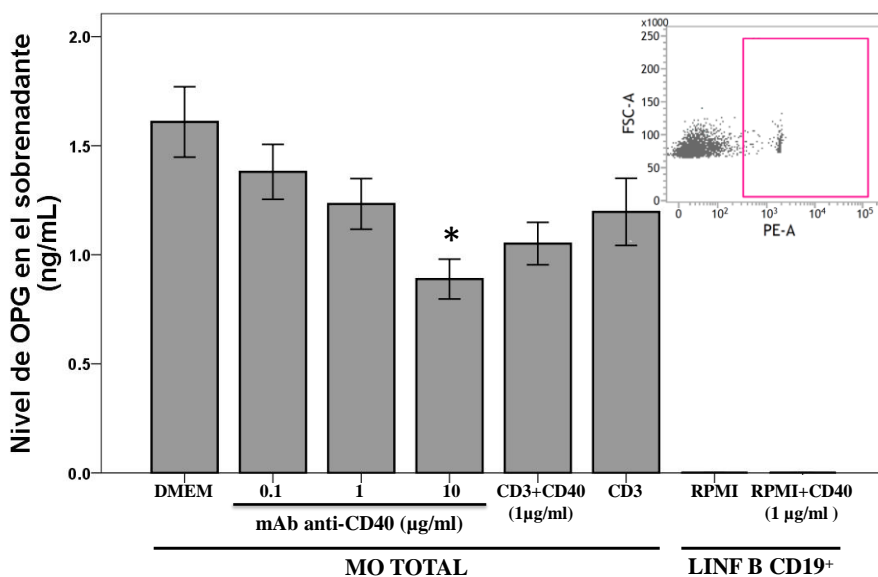
A la luz de los resultados del experimento piloto y con el objetivo de reforzar los resultados y comprobar el efecto sobre los cultivos de linfocitos B CD19<sup>+</sup> aislados, se realizó un nuevo experimento según lo descrito en el apartado 3.7.3.2. Se efectuaron determinaciones del nivel de OPG en el sobrenadante de los cultivos a los 3 y a los 6 días de cultivo. Los resultados a punto final se muestran en la Figura 64.

A los tres días de cultivo ya se observó una disminución significativa en el nivel de OPG en el sobrenadante ( $P=0.045$ ), para los pocillos estimulados con la dosis 10 µg/ml de anti-CD40 (resultados no mostrados).

Cuando se analizaron los resultados a tiempo final, la disminución del nivel de OPG en el medio se hizo más evidente para la dosis 10 µg/ml de anticuerpo anti-CD40 ( $P=0.004$ ), así como el efecto combinado de los

anticuerpos anti-CD40 y anti-CD3 (activador específico de células T), ambos a dosis de 1 µg/ml, que mostraron una tendencia clara a la disminución del nivel de OPG, rozando la significación estadística ( $P=0.051$ ).

Los cultivos de linfocitos B ( $CD19^+$ ) aislados de MO total no mostraron presencia de OPG en sobrenadante en ninguna de las condiciones ensayadas. Para comprobar que estos resultados negativos no fueran causados por la inviabilidad de las células, se tomaron alícuotas de estos cultivos y se marcaron con yoduro de propidio. Este colorante penetra en la célula y se une a los ácidos nucleicos en células necróticas y/o apoptóticas. El porcentaje de linfocitos dañados en nuestros experimentos fue de 1,04-4,52% dependiendo de la muestra. Se puede observar un histograma representativo en el extremo superior derecho de la Figura 64.



**Figura 64** Nivel de OPG en los cultivos de MO total y linfocitos B  $CD19^+$  tras la adición de diversos estímulos. El recuadro de la parte superior de la figura muestra una imagen de citometría que corrobora la viabilidad de los linfocitos B, mediante tinción con yoduro de propidio (p.h: Bonferroni).

\* =  $P < 0.05$

Con el objetivo de comprobar que las cantidades de células dispuestas en cada una de las condiciones experimentales hubieran sido las mismas, se determinó la cantidad de proteína presente en cada pocillo mediante el método Bradford. Un test ANOVA reveló que no existían diferencias significativas entre la cantidad de proteína presente en ninguna de las categorías, incluyendo los pocillos de Linfocitos B aislados, que presentaban la misma cantidad de proteína de cualquiera de los otros pocillos del experimento (resultados no mostrados).

#### **4.5. Caracterización de la fractura por fragilidad e identificación de nuevos biomarcadores indicadores del riesgo de fractura por fragilidad**

##### **4.5.1. Perfil antropométrico, densitométrico y de metabolismo óseo de la fractura por fragilidad**

La caracterización de la fractura por fragilidad ha supuesto un objetivo fundamental en esta Tesis Doctoral. Con este objetivo en mente, se decidió estudiar el perfil antropométrico y las características densitométricas de 96 pacientes de la Cohorte de Fractura (Tabla 43). Como se puede observar, las mujeres del grupo de Fractura presentan una edad media 10 años superior que el grupo Control, mientras que el IMC es similar.

Con respecto al estado óseo, la diferencia de la DMO en cuanto a CF es muy evidente con  $0.26 \text{ g/cm}^2$  de diferencia a favor de las mujeres del grupo Control, aunque esta diferencia es de solo  $0.13 \text{ g/cm}^2$  para CL. De hecho, cuando se analiza el Valor Z en CL, llama la atención que ambos grupos presentan un valor de DMO normal, mientras que esto no ocurre en CF, donde las mujeres Control muestran valores normales (Valor Z-CF: 0.922) mientras que las mujeres del grupo de Fractura muestran un valor peor que el de la media para su edad (Valor Z CF: -0.636).



**Tabla 43.** Características antropométricas y óseas de los grupos Control (osteoartritis) y Fractura incluidos en el estudio.

	<b>CONTROL (N=25)</b>	<b>FRACTURA (N=71)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Edad (años)</b>	69.2 ± 9.6	79.9 ± 8.6	<b>0.000</b>
<b>Peso (kg)</b>	70.6 ± 15.3	65.5 ± 11.0	0.129
<b>Altura (cm)</b>	158.8 ± 6.9	156.3 ± 5.8	0.130
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.9 ± 5.4	26.9 ± 4.5	0.436
<b>DMO-CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.956 ± 0.127	0.693 ± 0.123	<b>0.000</b>
<b>Valor T CF</b>	-0.200 ± 1.077	-2.387 ± 1.027	<b>0.000</b>
<b>Valor Z CF</b>	0.922 ± 1.161	-0.636 ± 0.806	<b>0.000</b>
<b>DMO-CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.114 ± 0.191	0.985 ± 0.199	<b>0.035</b>
<b>Valor T CL</b>	-0.713 ± 1.586	-1.788 ± 1.654	<b>0.034</b>
<b>Valor Z CL</b>	0.680 ± 1.617	0.312 ± 1.660	0.463

Dada la diferencia tan acusada entre grupos respecto a la edad, todos los análisis llevados a cabo se ajustaron por la covariable edad. Tal como puede observarse en la Tabla 44, el análisis ANCOVA reveló que el grupo Fractura muestra una mayor tasa de remodelado óseo como demuestran los valores más elevados de CTx ( $P=0.006$ ) y de osteocalcina ( $P=0.011$ ), marcadores de resorción y formación ósea, respectivamente.

Destaca también el nivel más elevado de fosfato en el grupo Fractura ( $P=0.003$ ), así como las diferencias detectadas en el perfil lipídico, que indican que las mujeres del grupo Fractura muestran menores niveles de colesterol ( $P=0.010$ ), HDL ( $P=0.001$ ) y una tendencia clara para los niveles de LDL ( $P=0.055$ ). Además, la Tabla 44 muestra una tendencia en las mujeres del grupo Fractura a tener niveles más elevados de glucosa ( $P=0.057$ ).

**Tabla 44.** Niveles séricos de parámetros relativos al estado basal de salud (glucosa y perfil lipídico) y de algunos marcadores bioquímicos de remodelado óseo ajustando por la covariable edad. Los valores se corresponden a las medias marginales estimadas  $\pm$ EE tras el ajuste por covariables.

	Control (n=25)	Fractura (n=71)	P-valor
<b>PTH (pg/ml)</b>	65.0 $\pm$ 6.4	59.7 $\pm$ 336	0.470
<b>CTx (ng/ml)</b>	0.517 $\pm$ 0.057	0.709 $\pm$ 0.032	<b>0.006</b>
<b>Calcio (mg/dl)</b>	8.56 $\pm$ 0.12	8.59 $\pm$ 0.07	0.801
<b>Fosfato (mg/dl)</b>	2.47 $\pm$ 0.12	2.87 $\pm$ 0.07	<b>0.003</b>
<b>FA (U/L)</b>	156.0 $\pm$ 18.1	165.5 $\pm$ 10.7	0.652
<b>FAO (<math>\mu</math>g/L)</b>	8.50 $\pm$ 0.70	9.48 $\pm$ 0.41	0.226
<b>Osteocalcina (ng/ml)</b>	14.2 $\pm$ 1.5	18.5 $\pm$ 0.9	<b>0.011</b>
<b>25(OH)D3 (ng/ml)</b>	12.7 $\pm$ 1.8	12.8 $\pm$ 1.0	0.976
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	160.3 $\pm$ 6.5	140.7 $\pm$ 3.8	<b>0.010</b>
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	115.5 $\pm$ 7.7	114.9 $\pm$ 4.6	0.947
<b>HDL (mg/dl)</b>	45.8 $\pm$ 1.8	38.9 $\pm$ 1.1	<b>0.001</b>
<b>LDL (mg/dl)</b>	99.6 $\pm$ 4.7	89.0 $\pm$ 2.8	<b>0.055</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	107.6 $\pm$ 4.8	118.3 $\pm$ 2.8	<b>0.057</b>

Con el fin de evaluar y caracterizar el estado óseo en estas condiciones, se analizaron para un subgrupo de sujetos (grupo Control N=17 y grupo Fractura N=39) una batería de ensayos mediante ELISA para diversas proteínas relacionadas con el metabolismo óseo, según lo especificado en el apartado 3.2.3.

En la Tabla 45 se muestran los valores séricos o plasmáticos de estas proteínas, ajustando por la covariable edad. Se puede observar que el grupo de Fractura muestra unos niveles de OPG un 36% más altos que los del grupo Control ( $P=0.032$ ). Asimismo, como se puede observar, los niveles de Osteocalcina y de CTx (determinado como ICTP) son más elevados en el grupo Fractura (ambos  $P<0.05$ ), lo que confirma mediante otras técnicas (ELISA) los datos referentes a estos metabolitos mostrados en la Tabla 44.

Los niveles de Esclerostina, COMP, Leptina y FGF23 no presentaron diferencias significativas tras la corrección por la covariable edad.

**Tabla 45.** Niveles séricos o plasmáticos de determinadas proteínas relacionadas con el metabolismo óseo. Los valores son las medias marginales estimadas  $\pm$ EE tras el ajuste por la covariable edad.

	Control (n=17)	Fractura (n=39)	P-valor
<b>OPG (pmol/L)</b>	11.2 $\pm$ 1.5	15.2 $\pm$ 1.0	<b>0.032</b>
<b>Esclerostina (pmol/L)</b>	81.0 $\pm$ 12.5	71.9 $\pm$ 8.3	0.549
<b>Osteocalcina (ng/ml)</b>	7.4 $\pm$ 1.2	11.0 $\pm$ 0.8	<b>0.014</b>
<b>COMP (ng/ml)</b>	1.9 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.2	0.821
<b>Leptina (ng/ml)</b>	29.9 $\pm$ 4.5	22.8 $\pm$ 2.8	0.182
<b>FGF23 (pg/ml)</b>	40.7 $\pm$ 5.9	41.2 $\pm$ 3.9	0.950
<b>ICTP (<math>\mu</math>g/L)</b>	5.7 $\pm$ 1.2	9.6 $\pm$ 0.8	<b>0.011</b>

*OPG: osteoprotegerina; COMP: proteína oligomérica de la matriz del cartílago; FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; ICTP: telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I.*

Con el objetivo de identificar el riesgo relativo con que contribuían todas estas variables a la fractura ósea se llevó a cabo un estudio de regresión logística multivariante usando como covariables todas las que figuran en la Tabla 44, además de la edad y la interacción edad-DMO de CF. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 46.

En este análisis, las variables que entraron en la ecuación se muestran juntas con el *Odds ratio* y el intervalo de confianza (95%) correspondiente a su modelo. Cuando se usaron edad, DMO CF y los 13 parámetros de la Tabla 44 como variables predictoras, las variables que entraron en la ecuación final fueron: Fosfato, Glucosa y DMO CF, siendo esta última la de mayor poder predictivo y un factor protector frente a la fractura (OR:  $9.7E^{-18}$ ,  $P=0.006$ ).

Sin embargo, cuando se analizaron estos parámetros bioquímicos junto con la edad, sin tener en cuenta la DMO, las variables predictoras fueron edad y fosfato, ambas de riesgo, y HDL como variable protectora.

**Tabla 46.** Riesgo de fractura obtenido del análisis de regresión logística. Además de las variables de la Tabla 44, se han usado como variables predictoras (covariables) la edad y la DMO de CF o solamente la edad.

Covariables incluidas	Variable predictora	Coef. RL	Odds ratio	IC 95%	P-valor
<b>Edad+</b> <b>DMO CF</b>	<b>DMO CF</b>	-39.27	9.7E <sup>-18</sup>	9.1E <sup>-30</sup> – 1E <sup>-5</sup>	<b>0.006</b>
	<b>Fosfato</b>	3.57	35.6	1.81 – 699.33	<b>0.019</b>
	<b>Glucosa</b>	0.13	1.14	1.03 – 1.26	<b>0.012</b>
<b>Edad</b>	<b>Edad</b>	0.15	1.17	1.08 – 1.27	<b>0.00006</b>
	<b>Fosfato</b>	1.56	4.74	1.49 – 15.07	<b>0.008</b>
	<b>HDL</b>	-0.084	0.919	0.86 – 0.98	<b>0.014</b>

En este punto es necesario comentar que, teniendo en cuenta que los niveles de fosfato pueden verse alterados por la aparición de una insuficiencia renal incluso en su nivel más leve, se corrigió el modelo para el fosfato, además de por las variables descritas, por la tasa de filtrado glomerular estimada (eGFR, *estimated Glomerular Filtration Rate*) (Campos-Obando *et al.* 2017) y el modelo permaneció inalterable (datos no mostrados).

#### 4.5.2. Identificación de nuevos biomarcadores predictores del riesgo de fractura: Estudio de miRNAs en la fractura ósea

Dada la importancia de la epigenética en general, y de los miRNAs en particular, en la regulación de la expresión génica y como determinantes en patologías complejas, se decidió evaluar el potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores de fractura ósea por fragilidad. La elaboración del perfil de miRNAs séricos expresados en la fractura ósea se realizó en dos fases como ya se ha comentado en el apartado 3.8. En la primera fase se elaboró un perfil de expresión de miRNAs en un pequeño grupo de muestras, uniendo las muestras en dos *pools*; Fractura ósea y Controles. En la segunda fase, se validaron los resultados obtenidos en un número mayor de muestras, analizándolas individualmente.

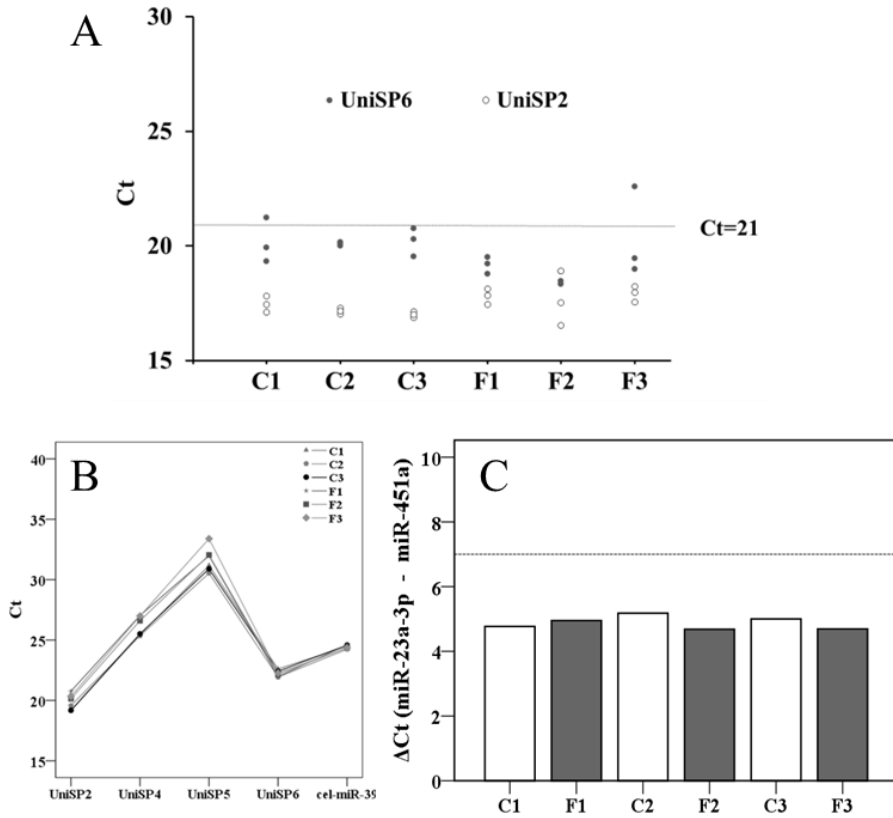
La primera fase de elaboración del perfil se realizó en 5 controles (grupo Control) y 8 pacientes con fractura ósea (grupo Fractura). Los parámetros antropométricos básicos se muestran en la Tabla 47.

**Tabla 47.** Características antropométricas y óseas de las pacientes utilizadas en la elaboración del perfil de miRNA en la fractura ósea.

	CONTROL (N=5)	FRACTURA (N=8)	P-valor
<b>Edad (años)</b>	63.4±8.1	79.6±3.1	<b>0.0003</b>
<b>Peso (kg)</b>	71.2±11.7	62.6±11.0	0.209
<b>Altura (cm)</b>	164.2±4.4	155.5±5.1	<b>0.009</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.4±4.4	26.0±4.9	0.866
<b>DMOe- CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.961±0.133	0.594±0.094	<b>0.0001</b>
<b>CF Valor T</b>	-0.140±1.101	-3.225±0.789	<b>0.0001</b>
<b>CF Valor Z</b>	0.680±1.152	-1.275±0.573	<b>0.002</b>
<b>DMOe- CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.165±0.199	0.833±0.181	<b>0.020</b>
<b>CL Valor T</b>	-0.300±1.625	-3.057±1.527	<b>0.020</b>
<b>CL Valor Z</b>	0.750±1.484	-0.686±1.370	0.139

Como era de esperar, dada la naturaleza de ambas intervenciones, existieron diferencias significativas entre grupos con respecto a la edad, altura y parámetros densitométricos.

Para la elaboración del perfil de miRNA se llevó a cabo el protocolo descrito en el apartado 3.8.1.1. En esta primera fase, las muestras se agruparon en dos *pools* de ARN (5 muestras controles y 8 muestras Fractura/*pool*) y además se realizaron tres síntesis de ADNc independientes para cada uno de los *pools*. En esta fase, para determinar la eficiencia de las extracciones de ARN y/o la presencia de inhibidores en la síntesis de ADNc o en la PCR se decidió cuantificar los niveles de dos ARNs controles (*spike-ins*) por PCR a tiempo real en cada paso del ensayo. Uno de los *spike-ins* se añadió antes de la extracción de ARN (UniSP2) y el otro durante la síntesis de ADNc (UniSP6). Los resultados mostraron que ambos *spike-ins* tenían niveles normales ( $Ct \leq 21$  ciclos) en los 6 ADNc obtenidos (Figura 65A). Así pues, todas las síntesis de ADNc se sometieron a este control de calidad.



**Figura 65.** Resultados de los controles técnicos y de calidad de las muestras en la fase de elaboración del perfil de miRNAs. **A)** El valor de Ct para los miRNAs controles (*spike-ins*) UniSP6 y UniSP2 en cada una de las muestras de ADNc obtenidas a partir de los *pools* de ARN control (C1-C3) y ARN fractura (F1-F3). Virtualmente todas las réplicas técnicas se sitúan bajo el umbral deseable de  $Ct \leq 21$  (línea horizontal). **B)** Determinación del valor de Ct para cada *spike-in* en las seis reacciones de síntesis de ADNc. El Ct representa claramente la concentración de cada *spike-in* añadido de acuerdo con el protocolo del fabricante (UniSP2>UniSP4>UniSP5 y UniSP6>cel-miR-39). **C)** Diferencia entre Ct para miR-23a-3p y miR-451a en cada reacción de síntesis de ADNc. La diferencia no alcanza el nivel de 7 (señalada como una línea discontinua horizontal), lo que sería indicativo de hemólisis, para ninguna de las síntesis de ADNc.

Por otra parte, ambos *spike-ins* añadidos durante la extracción de ARN, así como los añadidos durante la síntesis de ADNc estuvieron siempre en proporciones conocidas y constantes. Esto indicaba la ausencia de inhibidores

de la PCR ya que, de haberlos habido, los niveles de los *spike-ins* habrían ido decreciendo proporcionalmente (UniSP2 >UniSP4 >UniSP5 y UniSP6 >cel-miR-39), y como se muestra en la Figura 65B, los niveles fueron los esperados. El análisis estadístico confirmó la ausencia de *outliers* en los valores de Ct para los diferentes *spike-ins* en todos los paneles. En consecuencia, la presencia de inhibidores fue excluida y todos los paneles se incluyeron en el análisis

Un punto crítico en la determinación de los niveles séricos de miRNAs es la hemólisis, ya que los hematíes contienen niveles considerables de algunos miRNAs (Kirschner *et al.* 2011). Por ello, además del análisis de la oxihemoglobina realizado para cada suero mediante la cuantificación espectrofotométrica a 414nm, se determinó la presencia de hemólisis mediante el análisis de dos miRNAs, miR-23a, que no se encuentra afectado por hemólisis y miR-451a, específico de hematíes. La ratio entre los valores de Ct de ambos miRNAs determina el nivel de hemólisis (Punga *et al.* 2014), considerándose una muestra hemolizada si presenta un valor para esta ratio superior a 7 (hemólisis = (Ct mir-23a – Ct miR-451a) >7). Tal como se observa en la Figura 65C ninguna de nuestras muestras superaba este nivel.

Como los controles de calidad fueron óptimos, se procedió a analizar los resultados de la primera fase de elaboración del perfil. Un primer análisis determinó los genes expresados en cada uno de los *pools* de ARN por PCRs cuantitativas llevadas a cabo en triplicado. Se consideró como no expresados aquellos miRNAs con valores de Ct>37 en dos o más repeticiones.

De esta forma, de los 179 miRNAs ensayados presentes en el panel, no hubo expresión para 9 de ellos (miR-95, miR-182-5p, miR-204-5p, miR-190a, miR-200c-3p, miR-20a-3p, miR-208a, miR-200a-3p, y miR-92-3p).

Los valores de expresión para cada miRNA se normalizaron frente al valor medio de expresión para cada ADNc, excluyéndose del estudio aquellos miRNAs con valores medios de expresión de Ct>34, dado que este nivel de expresión indicaba una gran variabilidad.

El análisis detectó 42 miRNAs diferencialmente expresados entre los dos grupos (Valor *P* nominal) aunque este número se redujo a 12 miRNAs

significativos tras la corrección por el test FDR (Tabla 48). Los valores que se muestran son aquellos con un valor  $P < 0.05$  obtenido con un test t de Student realizado con los datos normalizados por transformación  $\log_2$ . Los  $Q$ -valores se calcularon como estimaciones del test FDR para comparaciones múltiples ( $Q$ -valores  $< 0.05$ ).

**Tabla 48.** Niveles de expresión de los miRNAs significativos entre ambos grupos en la fase de elaboración del perfil. En negrita se muestran los datos significativos. 12 de los 42 miRNAs resultaron significativos incluso tras la corrección por el test FDR. Los datos son medias  $\pm$ DE entre las tres réplicas realizadas de cada grupo de muestras. El signo del *Fold change* indica la expresión teniendo en cuenta que ésta se determina respecto al grupo control.

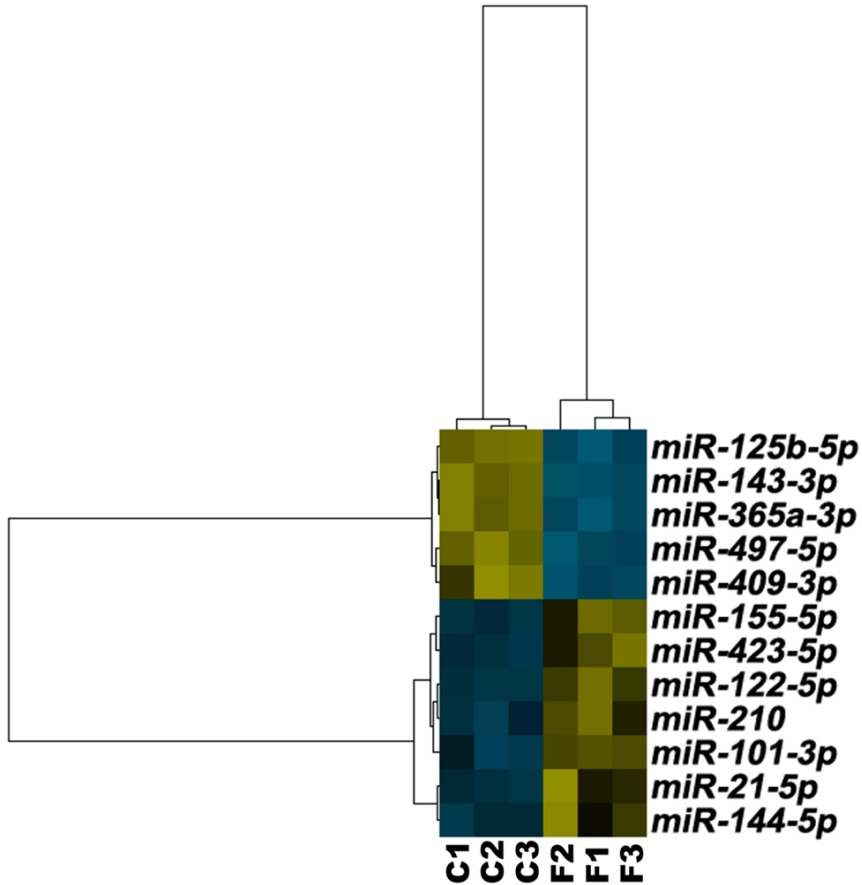
miRNA	CONTROL	FRACTURA	Fold change	P-valor	Q-valor
miR-143-3p	1.37 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.02	4.92	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>
miR-122-5p	1.00 $\pm$ 0.12	5.50 $\pm$ 0.69	-5.48	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.006</b>
miR-497-5p	0.41 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	2.07	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.006</b>
miR-155-5p	0.006 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.001	-3.67	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.006</b>
miR-125b-5p	1.46 $\pm$ 0.09	0.32 $\pm$ 0.07	4.62	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>
miR-423-5p	1.52 $\pm$ 0.02	2.43 $\pm$ 0.18	-1.60	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>
miR-365a-3p	1.28 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.06	5.90	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>
miR-101-3p	1.69 $\pm$ 0.15	2.87 $\pm$ 0.03	-1.70	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>
miR-409-3p	0.04 $\pm$ 0.01	0.015 $\pm$ 0.001	2.97	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.011</b>
miR-210	0.18 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.05	-2.37	<b>0.002</b>	<b>0.026</b>
miR-21-5p	15.4 $\pm$ 0.30	24.2 $\pm$ 2.7	-1.57	<b>0.002</b>	<b>0.033</b>
miR-144-5p	0.14 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.11	-3.45	<b>0.002</b>	<b>0.033</b>
miR-26b-5p	0.37 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.03	2.80	<b>0.004</b>	>0.05
miR-151a-3p	0.13 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	-1.37	<b>0.004</b>	>0.05
miR-551b-3p	0.07 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.01	4.12	<b>0.006</b>	>0.05
miR-18a-5p	0.44 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.03	1.67	<b>0.007</b>	>0.05
miR-195-5p	0.18 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.02	7.25	<b>0.008</b>	>0.05
miR-34a-5p	0.18 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	5.31	<b>0.009</b>	>0.05
miR-23b-3p	2.72 $\pm$ 0.26	2.06 $\pm$ 0.11	1.32	<b>0.019</b>	>0.05
miR-145-5p	0.83 $\pm$ 0.19	0.19 $\pm$ 0.09	4.44	<b>0.013</b>	>0.05
miR-338-3p	0.30 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.09	-1.64	<b>0.014</b>	>0.05
miR-29c-3p	2.41 $\pm$ 0.13	1.89 $\pm$ 0.17	1.27	<b>0.015</b>	>0.05
miR-133b	0.27 $\pm$ 0.10	0.04 $\pm$ 0.02	7.77	<b>0.015</b>	>0.05
miR-335-5p	0.19 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.02	2.87	<b>0.015</b>	>0.05
miR-133a	0.38 $\pm$ 0.11	0.06 $\pm$ 0.04	5.99	<b>0.016</b>	>0.05
miR-486-5p	9.32 $\pm$ 1.13	14.01 $\pm$ 1.80	-1.50	<b>0.018</b>	>0.05
miR-27b-3p	1.67 $\pm$ 0.25	1.10 $\pm$ 0.11	1.51	<b>0.019</b>	>0.05
miR-320b	1.00 $\pm$ 0.25	1.87 $\pm$ 0.18	-1.86	<b>0.019</b>	>0.05
miR-505-3p	0.07 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02	-1.95	<b>0.021</b>	>0.05



<b>miR-199a-3p</b>	1.40 ± 0.26	0.72 ± 0.18	1.94	<b>0.022</b>	>0.05
<b>let-7i-3p</b>	0.029 ± 0.010	0.010 ± 0.001	2.79	<b>0.025</b>	>0.05
<b>miR-193b-3p</b>	0.38 ± 0.04	0.08 ± 0.05	4.96	<b>0.025</b>	>0.05
<b>miR-132-3p</b>	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.08	-2.51	<b>0.030</b>	>0.05
<b>miR-296-5p</b>	0.009 ± 0.001	0.017 ± 0.001	-1.85	<b>0.030</b>	>0.05
<b>miR-22-3p</b>	3.59 ± 0.44	4.93 ± 0.62	-1.37	<b>0.032</b>	>0.05
<b>miR-10a-5p</b>	0.009 ± 0.001	0.015 ± 0.001	-1.71	<b>0.032</b>	>0.05
<b>miR-30e-3p</b>	0.035 ± 0.001	0.018 ± 0.010	1.91	<b>0.035</b>	>0.05
<b>miR-127-3p</b>	0.014 ± 0.001	0.021 ± 0.001	-1.48	<b>0.036</b>	>0.05
<b>miR-93-3p</b>	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.01	-1.71	<b>0.042</b>	>0.05
<b>miR-199a-5p</b>	0.47 ± 0.04	0.24 ± 0.09	2.00	<b>0.042</b>	>0.05
<b>let-7e-5p</b>	0.11 ± 0.04	0.24 ± 0.07	-2.15	<b>0.047</b>	>0.05
<b>miR-1</b>	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	2.46	<b>0.047</b>	>0.05

La Figura 66 muestra el agrupamiento jerárquico de los datos de expresión normalizados de los 12 miRNAs que pasaron el test FDR. Los dos grupos de muestras se separan claramente. Así, en el grupo Fractura se encontraban sobreexpresados los miRNAs miR-144-5p, miR-21-5p, miR-101-3p, miR-210, miR-122-5p, miR-423-5p, y miR-155-5p; mientras que en el grupo Control los miRNAs que mostraron sobreexpresados fueron miR-143-3p, miR-497-5p, miR-125b-5p, miR-365a-3p, y miR-409-3p (Tabla 48; Figura 66).

Una vez establecido el perfil de miRNAs diferencialmente expresados entre ambos grupos, se procedió a validar individualmente los resultados en un conjunto de muestras mayor. Para ello se analizaron la expresión de 5 miRNAs que pasaron el test FDR (Tabla 48) y que, tras consultar en la bibliografía, se podían relacionar con el metabolismo óseo (miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, y miR-21-5p), además de miR34a-5p, que se había postulado como un nuevo supresor de la resorción ósea (Krzyszinska *et al.* 2014). Durante el análisis se excluyeron tres muestras por no cumplir el criterio de calidad ( $Ct < 21$ ) para el *spike-in* UniSP2.



**Figura 66.** Agrupamiento jerárquico de los valores normalizados de expresión de los 12 miRNAs que pasaron en test FDR. Para generar el dendrograma que muestra la jerarquía entre grupos y genes, se utilizó el *software* EXIQON, aplicando la distancia euclídea y el método de asociación promedio. En tonos verdes se representa una mayor expresión y en tonos azules una expresión menor.

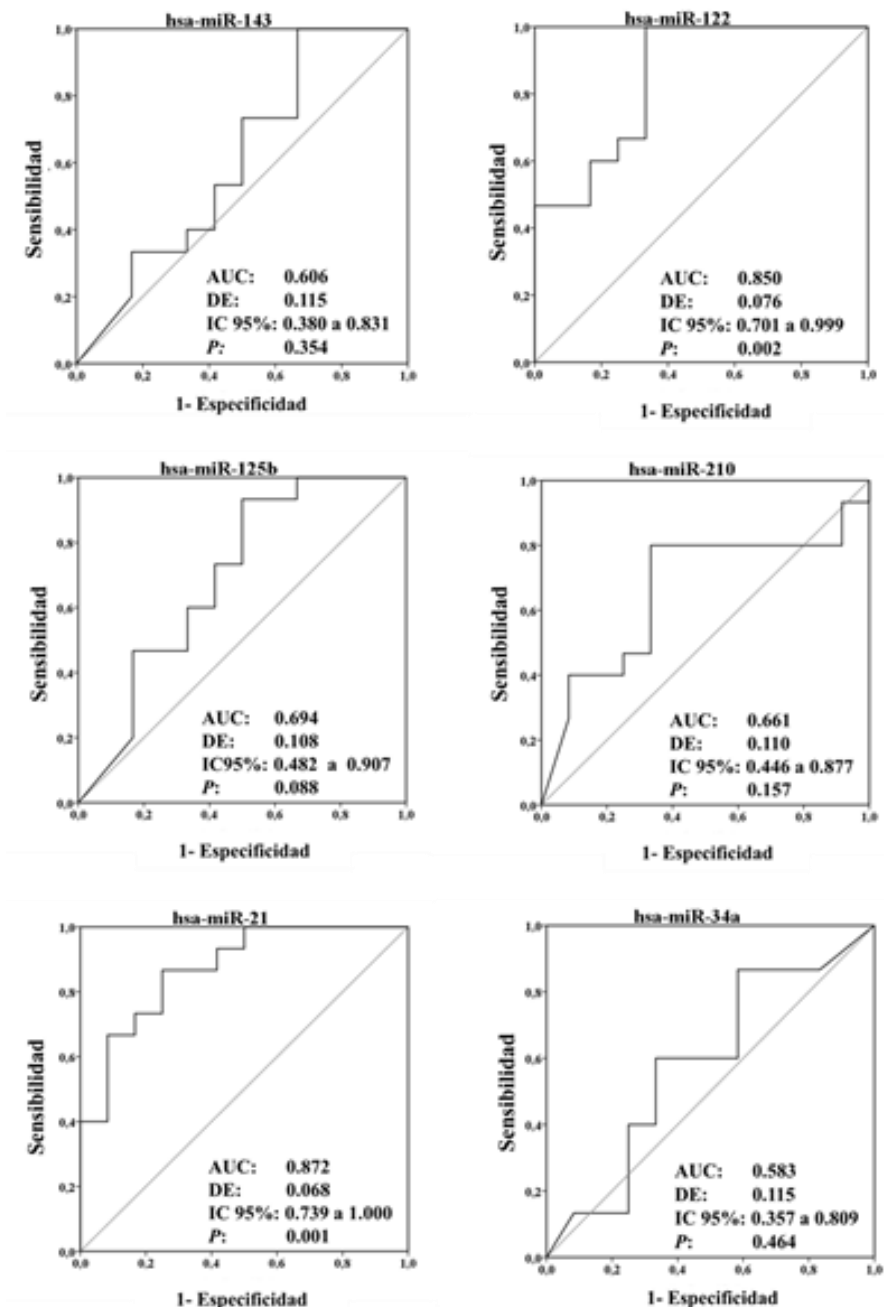
Las características antropométricas, bioquímicas y óseas de las mujeres analizadas en esta fase (N=27) se muestran en la Tabla 49. El grupo de Fractura presentaba una edad más avanzada, mostró peores parámetros óseos, especialmente en cadera, y además mostró niveles significativamente mayores de osteocalcina y CTx.

**Tabla 49.** Características antropométricas, bioquímicas y óseas de las mujeres seleccionadas para la validación de los datos del perfil de expresión entre el grupo de mujeres con fractura de CF (FRACTURA) y osteoartritis (CONTROL).

	CONTROL (N=12)	FRACTURA (N=15)	P-valor
<b>Edad (años)</b>	65.4 ± 10.5	81.0 ± 5.4	<b>0.00004</b>
<b>Peso (kg)</b>	70.2 ± 17.3	61.9 ± 13.6	0.218
<b>Altura(cm)</b>	160.9 ± 5.9	157.3 ± 5.6	0.165
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.0 ± 6.0	24.9 ± 4.8	0.366
<b>PTH (pg/ml)</b>	59.8 ± 25.2	57.3 ± 28.1	0.818
<b>25(OH)D3 (ng/ml)</b>	13.4 ± 9.3	9.9 ± 6.1	0.256
<b>CTx (ng/ml)</b>	0.39 ± 0.11	0.78 ± 0.22	<b>0.00002</b>
<b>OC (ng/ml)</b>	12.3 ± 4.6	21.1 ± 6.2	<b>0.001</b>
<b>FA total (U/L)</b>	176.8 ± 84.5	219.1 ± 110.0	0.283
<b>FA ósea (µg/L)</b>	7.8 ± 4.1	9.7 ± 3.6	0.236
<b>Calcio (mg/dl)</b>	8.5 ± 0.8	8.6 ± 0.4	0.692
<b>Fosfato (mg/dl)</b>	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.4	0.348
<b>DMOe-CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.968 ± 0.115	0.602 ± 0.095	<b>&lt;0.000</b>
<b>CF Valor T</b>	-0.100 ± 0.957	-3.146 ± 0.813	<b>&lt;0.000</b>
<b>CF Valor Z</b>	0.667 ± 0.893	-1.192 ± 0.507	<b>&lt;0.000</b>
<b>DMOe-CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.168 ± 0.163	0.900 ± 0.172	<b>0.007</b>
<b>CL Valor T</b>	-0.257 ± 1.351	-2.489 ± 1.458	<b>0.007</b>
<b>CL Valor Z</b>	0.657 ± 1.205	-0.133 ± 1.208	0.215

*IMC, índice masa corporal; PTH, Hormona paratiroidea; CTx, telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I; FA, fosfatasa alcalina; 25(OH)-D3, 25-hidroxicolecalciferol; OC, osteocalcina; DMO, densidad mineral ósea.*

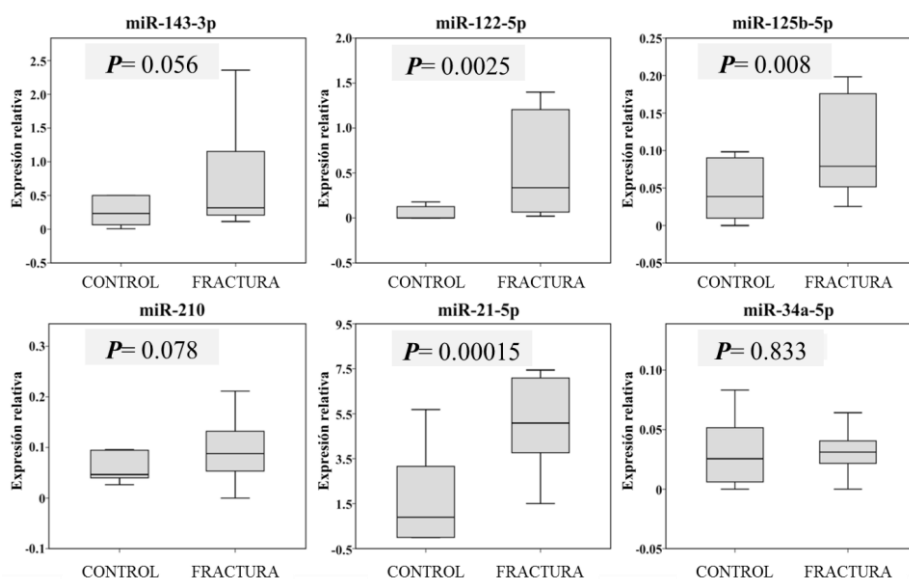
Para establecer el valor diagnóstico de los seis miRNAs séricos en la etapa de validación, se llevó a cabo un análisis ROC. Los resultados revelaron que 3 de ellos (miR-122-5p, miR-125b-5p y miR-21-5p) tenían valores de área bajo la curva (AUC) mayores de 0.7 ( $P < 0.05$ ), especialmente miR-122-5p y miR-21-5p (ambos  $P < 0.0013$ ) (Figura 67), lo que indica que la determinación de sus valores en suero podría usarse como biomarcadores para distinguir entre pacientes de fractura de los controles osteoartroticos.



**Figura 67.** Área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC para miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, miR-21-5p y miR-34a-5p. Se muestran los valores de AUC, los intervalos de confianza del 95% y los valores P correspondientes.

En la Figura 68 se muestra la media relativa de los valores de expresión (normalizada respecto a la media de miR-93-5p, según lo descrito en el apartado 3.8.2). De los 6 miRNAs escogidos para la validación, sólo 3 de ellos (miR-122-5p, miR-125b-5p, y miR-21-5p) mostraron diferencias significativas entre grupos.

Resaltar que los miRNAs con mayor valor diagnóstico, muestran valores de  $P$  más significativos, y están expresados en mayor medida en el suero de los pacientes de fractura ósea.



**Figura 68.** Diagrama de cajas que muestra el rango intercuartílico y la media de los niveles de expresión de miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, miR-21-5p, y miR-34a-5p en la etapa de validación. Los valores representan los niveles relativos normalizados contra los niveles del miRNA control miR-93-5p.

En la etapa de validación se incluyeron en torno a un 42% de sueros hemolizados (7 de 15 pacientes de fractura y 5 de 12 controles) para determinar el efecto de la hemólisis sobre la expresión de los tres miRNAs diferencialmente expresados (miR-122-5p, miR-125b-5p y miR-21-5p). No hubo diferencias significativas entre grupos para los niveles de cada miRNA

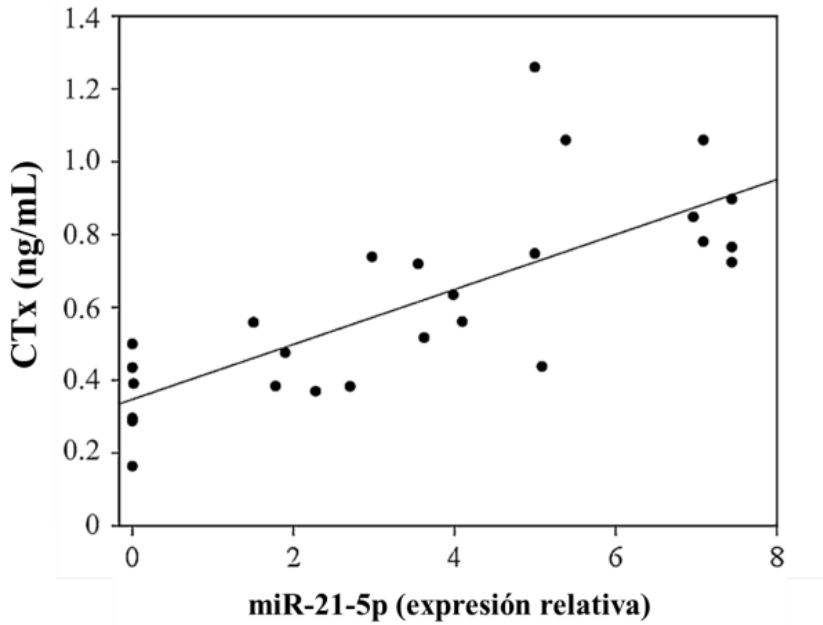
si se tenía en cuenta la variable de muestra hemolizada (sí/no) como variable dependiente en un test ANOVA (no mostrado), indicando que los niveles de los tres miRNAs no se encontraban afectados por la hemólisis.

De manera interesante se detectó una correlación muy buena entre los niveles de miR-21-5p y los de CTx ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.00001$ ) (Figura 69).

Teniendo en cuenta que los niveles de miR-21-5p correlacionaron positiva y significativamente con los niveles de miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b y miR-210-5p; éstos muestran a su vez correlación positiva con el nivel de CTx, aunque sólo fueron significativos miR-122-5p ( $r=0.59$ ,  $P=0.002$ ), miR-125b-5p ( $r=0.56$ ,  $P=0.003$ ), y miR-210 ( $r=0.50$ ,  $P=0.009$ ) (no mostrado).

Respecto a otras correlaciones, miR-125b-5p ( $r=0.43$ ,  $P=0.03$ ) y miR-21-5p ( $r=0.51$ ,  $P=0.008$ ) correlacionaron positivamente con los niveles de osteocalcina; miR-125b-5p correlacionó con los niveles de fosfato ( $r=0.40$ ,  $P=0.013$ ), y tanto miR-122-5p como miR-21-5p mostraron una tendencia ( $P < 0.08$ ) en la correlación con los niveles de fosfatasa alcalina total, y también de su isoenzima ósea, aunque sólo la correlación entre miR-122-5p con la fosfatasa alcalina total resultó significativa ( $P=0.037$ ). Los niveles de miR-210 correlacionaron positivamente además con los niveles de fosfatasa alcalina ósea ( $r=0.52$ ,  $P=0.007$ ) (no mostrado).

Finalmente, dado que la edad era un factor significativamente diferente entre grupos, se realizó un test ANCOVA ajustando por edad (no mostrado). Solamente la diferencia para miR-21-5p fue significativa (media marginal estimada  $\pm$  DE para pacientes con fractura:  $5.20 \pm 0.64$  vs.  $1.69 \pm 0.75$  para controles;  $P=0.005$ ), Si bien es cierto que se observó una tendencia para miR-125b-5p (media ajustada  $\pm$  DE para pacientes con fractura:  $0.11 \pm 0.02$  vs.  $0.05 \pm 0.02$  para controles;  $P=0.096$ ).



**Figura 69.** Recta de regresión que muestra la correlación entre los niveles de expresión de miR-21-5p y los niveles de CTx en todas las muestras de la fase de validación. Los valores de expresión para miR-21-5p son niveles normalizados relativos a los niveles de expresión del miRNA control miR-93-5p.





# 5. DISCUSIÓN



### **5.1. Identificación de nuevos genes candidatos para el estudio de su asociación a DMO**

En los últimos años se han usado diferentes aproximaciones experimentales para buscar genes asociados a la susceptibilidad a padecer osteoporosis, entre las que encontramos estudios de ligamiento, de asociación, estudios en modelos animales, aproximaciones a gran escala, etc. (Ralston and Uitterlinden 2010).

De entre estas aproximaciones, los estudios de asociación son los más indicados para buscar variantes asociadas a fenotipos complejos ya que pueden detectar variantes con efecto débil en la varianza fenotípica total. Así, inicialmente se trabajó de manera intensa bajo hipótesis previas, es decir, proponiendo genes candidatos para su estudio en base a nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de la pérdida ósea. Este tipo de aproximación, como se verá más adelante, ha revelado gran cantidad de polimorfismos asociados a fenotipos óseos. Estas asociaciones se han observado principalmente con DMO y fractura ósea, en genes relacionados con metabolismo óseo y con la ruta endocrina del estrógeno, así como con genes que codifican para hormonas calciotropas, citoquinas y sus receptores, especialmente los genes que codifican para RANKL, RANK y OPG, entre otros (Li *et al.* 2010; Ralston and Uitterlinden 2010; Mitchell and Yerges-Armstrong 2011).

A pesar de la importancia de estos estudios, muchas de estas asociaciones no han sido replicadas en cohortes independientes (Uitterlinden *et al.* 2006; Duncan and Brown 2010; Li *et al.* 2010; Ralston and Uitterlinden 2010), lo que resta credibilidad a estos estudios.

Más recientemente, gracias a las ventajas que aportan los métodos de genotipado a gran escala, y la introducción de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y meta-análisis en grandes cohortes, se ha aumentado el número de genes asociados a los fenotipos de interés, detectando a menudo rutas y genes inesperados. En este sentido esta tecnología ha supuesto una revolución que ha incrementado el número de rutas y genes probablemente involucrados en la fisiopatología de estos

fenotipos (Estrada *et al.* 2012; Hsu and Kiel 2012; Liu *et al.* 2014; Rivadeneira and Mäkitie 2016).

Sin embargo, estas aproximaciones no están exentas de limitaciones. Algunas de ellas son la falta de grupos caso y control bien definidos, un tamaño muestral insuficiente, ausencia de ajuste mediante variables confusoras, ausencia de correcciones debido para comparaciones múltiples, o no considerar la existencia de subestructuras o lo que es lo mismo, la estratificación poblacional (Pearson and Manolio 2008; John Hardy and Singleton. 2009).

Una vez establecida la asociación de las variantes a los fenotipos óseos, se debería contrastar la participación de los polimorfismos descritos en los diferentes estudios de asociación con la fisiopatología de la osteoporosis, para lo cual, se puede analizar la posible funcionalidad de estas variantes genéticas usando aproximaciones *in vitro*, y/o realizar estudios de replicación en cohortes independientes de la cohorte de descubrimiento, para aumentar la potencia estadística.

A pesar de todos estos esfuerzos, a día de hoy, somos capaces de explicar una parte muy pequeña de la heredabilidad asociada a estos fenotipos (Estrada *et al.* 2012). Entre otras causas, esto se relaciona con la gran imposición del tratamiento estadístico para comparaciones múltiples y la posible inflación de la heredabilidad en estos fenotipos (Chen *et al.* 2015). Como resultado, en los últimos años se ha realizado un intento de caracterizar la heredabilidad perdida a través de otras aproximaciones, como el análisis genético de variantes raras o estructurales, eventos epigenéticos o epistasias (Manolio *et al.* 2009; Robinson *et al.* 2014).

### **5.1.1. Replicación de asociaciones halladas en otras cohortes y ampliación de estudios propios**

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue el de intentar replicar, en nuestra cohorte de mujeres, la asociación de tres polimorfismos funcionales que habían sido asociados a fenotipos óseos previamente. En

concreto se analizaron tres SNPs pertenecientes a los genes *LRP5*, *TNFRSF11B* y *FGFBP1*. Estos tres genes juegan papeles fundamentales dentro de la regulación de la homeostasis ósea, por una parte, *LRP5* codifica para la proteína LRP5, un componente clave en la transducción de señal de la vía Wnt, el gen *TNFRSF11B* codifica para la Osteoprotegerina, que como ya se ha visto es un regulador clave de la vía de regulación de la homeostasis ósea RANK/RANKL y *FGFBP1*, por su parte, codifica para la proteína del mismo nombre, encargada de la proliferación, diferenciación y migración de los fibroblastos.

Estos tres polimorfismos se catalogaron como funcionales ya que afectaban a la expresión génica en estudios *in vitro* (Hoppman *et al.* 2010; Agueda *et al.* 2011; Vidal *et al.* 2011).

Las frecuencias alélicas y genotípicas se describen en la Tabla 18. Para el polimorfismo rs312009 en el gen *LRP5*, éstas son virtualmente idénticas a las descritas en otra cohorte española mediterránea (Agueda *et al.* 2008), mientras que las frecuencias para los SNPs rs4876869 y rs12503796, en los genes *TNFRSF11B* y *FGFBP1* respectivamente, son similares a aquellas publicadas en la base de datos dbSNP para una población de ascendencia europea (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El hecho de que las frecuencias genotípicas observadas se encuentren en equilibrio de Hardy–Weinberg es indicativo, por una parte, de que nuestra cohorte está conformada por una población única sin subestructuras tal como se había descrito previamente (Pineda *et al.* 2010) y por otra parte, de que no hay errores o sesgos en el genotipado.

Nuestros resultados corroboran la asociación del SNP rs312009 (C>T) del gen *LRP5* con fenotipos óseos en columna lumbar que se había encontrado en otra cohorte española (Agueda *et al.* 2008). En nuestro caso, la asociación fue con un modelo de herencia dominante para el alelo T, por lo que mujeres TT/TC mostraron mejores parámetros óseos (Tabla 18

).

El grupo de Águeda y col. (Águeda *et al.* 2008), describió que mujeres postmenopáusicas con genotipo TT para este gen mostraban mayor DMO en columna lumbar que aquellas con genotipo TC/CC. Sin embargo, estos autores asignaron a este SNP un modelo de herencia recesivo, por lo que estas mujeres de genotipo TT (media 0.925 g/cm<sup>2</sup>) mostraron mayor DMO de CL que aquellas de genotipo TC y CC, aunque dentro de este grupo, las mujeres TC (media 0.857 g/cm<sup>2</sup>) mostraron mejores parámetros óseos comparado con las mujeres de genotipo CC (media 0.848 g/cm<sup>2</sup>).

En cualquier caso, tanto en el presente estudio como en el de Águeda y col., el SNP rs312009 resultó asociado a CL pero no con CF. En el presente estudio, las mujeres con genotipo CC presentaron menor DMO-CL (Tabla 20) y, por tanto, mayor riesgo de osteoporosis en CL.

El SNP rs312009 (C>T) del gen *LRP5* está localizado en la región 5' del gen *LRP5*, el sitio de unión del factor de transcripción RUNX2. En este caso se demostró que el alelo T muestra una mayor tasa de transcripción que el alelo C mediante ensayos de gen reportero, probablemente debido a que el alelo T genera una secuencia más similar a la secuencia consenso para RUNX2 (Águeda *et al.* 2008).

El estudio de Águeda y col. asignó a este polimorfismo un modelo de herencia recesivo, sin embargo, en nuestro estudio se detectó un modelo de herencia dominante para el alelo T de este SNP, lo que puede ser más consistente con la funcionalidad descrita previamente para esta variante génica. Si estos resultados *in vitro* fueran perfectamente trasladables a lo que ocurre *in vivo*, el incremento de la transcripción del gen *LRP5* en mujeres con uno o dos alelos T podría resultar en una DMO aumentada y esto podría parecer un modelo de herencia dominante. En cualquier caso, esto requiere más experimentos en los que se analice la tasa de transcripción o el nivel de expresión *in vivo* del gen *LRP5* para cada genotipo, con el objetivo de establecer qué modelo está más cercano a la realidad.

Aunque el SNP rs312009 no había sido asociado previamente en GWAS o meta-análisis, el locus de *LRP5* lo ha sido en numerosas ocasiones (Kiel *et*

*al.* 2007; Richards *et al.* 2009; Rivadeneira *et al.* 2009; Estrada *et al.* 2012). Esto refuerza la importancia del gen *LRP5* en el metabolismo óseo, como se ha mostrado claramente por los fenotipos óseos extremos causados por mutaciones de ganancia o pérdida de función de este gen (Gong *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1997b).

El polimorfismo rs4876869 (A>G) localizado en el intrón 2 del gen *TNFRSF11B*, se asoció a DMO ( $P=0.01$ ) como parte de un haplotipo junto con otros dos SNPs del exón 1 del gen (Vidal *et al.* 2011). En nuestro trabajo, al analizar este polimorfismo de manera individual, detectamos únicamente una pequeña tendencia no significativa a la asociación con DMO, fundamentalmente en CF. En el trabajo de Vidal y col. se había descrito que este polimorfismo afecta a la expresión génica de *TNFRSF11B*, de manera que el alelo G aumenta la frecuencia de omisión del exón 3 *in vitro*, lo que conlleva a la generación de una proteína OPG acortada, que no es funcional. Por lo tanto, las mujeres portadoras del alelo G deberían mostrar parámetros óseos alterados, al contrario de lo encontrado en el presente estudio (Tabla 18 y

).

En cualquier caso, como se indica en el estudio de Vidal y col., el riesgo de tener baja DMO estaría impuesto por el polimorfismo C950T localizado en la región 5' no traducida del primer exón del gen *TNFRSF11B* y no está condicionado por tener el alelo A o G en el SNP rs4876869. Aunque este SNP no se asocia a fenotipos óseos en ningún estudio, el locus *TNFRSF11B* se ha asociado repetidamente a fenotipos óseos en GWAS y meta-análisis, mostrando la importancia del gen de la OPG en la homeostasis ósea (Richards *et al.* 2008, 2009; Rivadeneira *et al.* 2009). De hecho, en una revisión en la que se analizaron más de 40 estudios GWAS de DMO, se detectaron 66 *loci* que resultaron asociados en al menos dos de los estudios, y sólo 7 de ellos habían sido previamente detectados por estudios de asociación en genes candidatos (Hsu and Kiel 2012). Entre ellos se encontraban los *loci* *LRP5* y *TNFRSF11B*.

Respecto al SNP rs12503796 localizado en la región promotora del gen *FGFBP1*, en nuestro estudio no se consiguió replicar la asociación a DMO encontrada por Hoppman y col. (Hoppman *et al.* 2010). El hecho de que ningún otro grupo haya conseguido detectar esta asociación apoya nuestros resultados.

En este estudio los autores describieron que el SNP rs12503796 es funcional, ya que el alelo T se asocia a una disminución de la expresión del gen *FGFBP1*, e inhibe la sobre-expresión del gen de la testosterona *in vitro*, probablemente porque el alelo destruye un sitio de unión para el receptor de estrógenos, lo que puede contribuir a variaciones en la DMO. Aunque Hoppman y col., describen una estrecha asociación de este polimorfismo con algunos fenotipos óseos en poblaciones Mejicano-americanas, así como una replicación en una población Amish, en nuestra población no encontramos asociación. Su estudio refleja además una asociación estratificada por sexo, encontrándose una asociación exclusiva en el sexo masculino (Hoppman *et al.* 2010), lo cual podría explicar nuestros resultados negativos.

Aunque los tres polimorfismos analizados en el presente estudio se habían descrito como funcionales ya que afectaban la expresión de sus genes correspondientes y eran capaces de contribuir a las variaciones en DMO, ninguno de ellos ha sido asociado en estudios epidemiológicos ni de poblaciones. Una posible explicación para esto podría ser que, aunque una variante particular altere la expresión génica *in vitro*, la tasa total de expresión génica *in vivo* para un gen particular puede depender de otros elementos reguladores, no solo elementos en *cis*, sino también elementos en *trans*. Por tanto, puede haber otras secuencias, variantes genéticas, factores de transcripción y otros mecanismos epigenéticos implicados en las variaciones de la tasa de transcripción (Mattick *et al.* 2010).

### **Ampliación estudios propios previos**

El estudio del sistema CD40/CD40L ha sido un eje central de este trabajo de Tesis Doctoral y uno de los objetivos principales fue el de continuar



con la caracterización del mismo, ampliando el estudio de los SNPs de estos genes y tratando de establecer su asociación a fenotipos óseos.

Este sistema se ha venido estudiando por el grupo desde hace años, y en un estudio previo ya se describió la interacción entre variantes en los genes *CD40* y *CD40L* respecto al fenotipo óseo DMO y al riesgo de padecer osteoporosis/osteopenia (Pineda *et al.* 2011). La razón por la que hemos aumentado el número de SNPs a estudiar en ambos genes con respecto al trabajo previo, ha sido realizar una aproximación analítica *gene-wide*, la cual busca patrones de asociación dentro del gen para profundizar en la caracterización de su asociación a fenotipos óseos.

En general, los resultados presentados en nuestro trabajo refuerzan las observaciones genéticas previas, demostrando la asociación entre DMO-CL y *CD40L* mediante el análisis de gran número de SNPs en un mayor número de mujeres con estudios densitométricos. Aunque dos SNPs del gen *CD40* presentaron asociación a DMO de CL y de CF (Valor *P* nominal <0.05), tal asociación no superó la corrección por comparaciones múltiples que se tuvo que aplicar debido al número de SNPs estudiados.

Un resultado reseñable del presente estudio fue la tendencia tan marcada que mostraron las mujeres homocigotas para el alelo T del SNP rs1883832 del gen *CD40* a presentar niveles más bajos de OPG que las mujeres de genotipos CC y CT (Valor *P* ajustado =0.0049; Valor *Q*= 0.059) (Tabla 23).

La relación entre el genotipo TT para este SNP y los bajos niveles de OPG es interesante por varias razones. Nuestro grupo había descrito previamente una menor DMO para las mujeres homocigotas para el alelo T (Pineda *et al.* 2008, 2011). Además, se ha descrito que los individuos homocigotos para el alelo T muestran un descenso del 39.4% en la expresión de CD40 en la superficie de las células B (Jacobson *et al.* 2005), y que la co-estimulación de CD40 con anticuerpos activadores o con la proteína recombinante CD40L, promueve la producción de OPG por parte de las células B de la médula ósea *in vivo* (Li *et al.* 2007a).

Todos estos datos tomados en conjunto sugieren que la disminución de masa ósea que presentan las mujeres homocigotas TT para el SNP rs1883832

de *CD40*, tanto en los estudios previos (Pineda *et al.* 2011), como en los realizados en el presente trabajo (Panach *et al.* 2016), puede deberse a una disminución en la producción de OPG en la médula ósea. Los resultados que se muestran en la Tabla 24 apoyan esta posibilidad. De hecho, si analizamos los datos de OPG para las mujeres de nuestro estudio, al seleccionar aquellas de los cuartiles extremos según la DMO, las mujeres de genotipo TT se encuentran significativamente alojadas en el grupo de menor nivel de DMO y de OPG sérica.

### **5.1.2. Estudios traslacionales a partir de modelos animales y celulares**

Nuestro grupo ha apostado desde hace tiempo por los estudios traslacionales desde modelos animales o celulares para engrosar la lista de genes candidatos para su estudio de asociación a fenotipos óseos. En este trabajo de Tesis Doctoral se han realizado varios estudios apoyados en este enfoque traslacional con el objetivo de identificar nuevos genes asociados a fenotipos óseos, utilizando la expresión génica global de dos grupos de muestras.

#### **Estudios traslacionales a partir del modelo de ratona ovariectomizada**

En este trabajo se han realizado dos estudios en los que se ha empleado a la ratona ovariectomizada como modelo animal de pérdida ósea acelerada trasladable a la mujer postmenopáusica, con el fin de identificar potenciales genes candidatos que se alteren con la ovariectomía y así poder trasladar el estudio de estos genes a la cohorte de mujeres.

La elección de este modelo animal se basó en la experiencia previa de nuestro grupo que lo ha venido usando como modelo de pérdida ósea acelerada para que nos informase de lo que ocurre en la mujer postmenopáusica (García-Pérez *et al.* 2006a; c; Cano *et al.* 2008). Las ratonas ovariectomizadas presentan un déficit estrogénico muy similar al que se da tras la menopausia, siendo este déficit la causa primaria de pérdida ósea y osteoporosis en mujeres (Riggs *et al.* 1998).

### Estudio de la OVX sobre la expresión génica de la MO total

Cuando se analizó la expresión génica diferencial en médula ósea total entre ratonas OVX y SHAM mediante *microarrays* de expresión, se detectaron 180 genes con cambios significativos de expresión (Pineda *et al.* 2014). Estos genes estaban mayoritariamente sobre-expresados tras la OVX, tal como se había descrito previamente (Xiao *et al.* 2007).

Cuando se validó la técnica usada (*microarrays*) por otra tecnología distinta, como es el análisis MassARRAY QGE (Sequenom), se validaron 8 de los 12 genes analizados, aunque los otros 4 genes restantes mostraron una clara tendencia como muestran los ratios OVX/SHAM y los valores de *P* (Tabla 31). El hecho de que esta correlación entre los resultados de ambas técnicas no sea absoluta puede deberse a dos razones fundamentales. La primera es que en este caso se usaron *pools* para el experimento de *microarrays* y muestras individuales para el estudio de Sequenom. La segunda es que para la mayoría de transcritos la concentración molar fue muy pequeña, lo cual confiere una importante variabilidad al estudio, dificultando la obtención de la significación estadística cuando se usaron ARNs individuales.

El análisis de las rutas canónicas en este experimento reveló la diferenciación, desarrollo y activación de la célula B como la ruta de señalización más significativa en médula ósea de ratón tras la ovariectomía (ANEXO VI y Figura 40). Esto justificó, en gran parte, la elección de la célula B de médula ósea de ratona OVX para el segundo experimento traslacional (ver más adelante).

Dentro de este grupo de genes diferencialmente expresados tras la OVX encontramos genes implicados en la transducción de señal de la célula B (*Bcr*, *Blnk*, *CD79a*, *CD79b*, *Syk*) en la diferenciación de la célula B (*Vpreb1*, *Igll1*, *Ebf1*, *Syk*, *Dntt*) y en la activación de células B y T (*Ptprcap*, *Tnfrsf13b*, *Mapk13*, *Il2ra*, *CD40*, *Ccr7*).

La deficiencia de estrógenos induce la linfopoyesis B (Masuzawa *et al.* 1994; García-Pérez *et al.* 2006a) y aunque la célula B parece estar implicada

en la pérdida ósea, su papel no está exento de controversia (ver apartado 5.2) Efectivamente, existen múltiples evidencias que apoyarían la relación de la célula B con la pérdida ósea. Se ha publicado que la administración de IL7 a ratones induce linfopoyesis B y destrucción de hueso por parte de los OCs (Miyaura *et al.* 1997), que las células B maduras y sus precursores pueden expresar RANKL (Han *et al.* 2006), que los precursores de células B estarían implicados en la resorción ósea, ya que tienen la capacidad de diferenciarse directamente a OCs (Torraldo *et al.* 2003) y que la depleción de células B en pacientes con artritis reumatoide suprime el recambio óseo (Wheater *et al.* 2011).

En contra de estos argumentos, se ha publicado que la pérdida ósea inducida por la OVX ocurre independientemente de células B (Li *et al.* 2007b), que las células B son los mayores productores del factor anti-osteoclastogénico OPG, que los ratones deficientes en células B son osteoporóticos (Li *et al.* 2007a), y que las células B maduras de sangre periférica inhiben la formación osteoclastica en un modelo de osteoclastogénesis humano *in vitro*, mediante un mecanismo que implica al factor TGF- $\beta$  (Weitzmann *et al.* 2002).

A pesar de la controversia, está aceptado que las células B activadas pueden ser potentes reguladores de la resorción ósea (Horowitz *et al.* 2010). De hecho el gen *IL2ra* (CD25), que es un marcador de la activación celular, está sobre-expresado en el presente estudio y esto, tal como se había descrito previamente por nuestro grupo (García-Pérez *et al.* 2006a; c), indica que la OVX induce la activación de células B y T (Li *et al.* 2011).

Sea cual sea el rol de las células B en la regulación de la homeostasis ósea, lo cierto es que la ruta de diferenciación de este tipo celular es la vía canónica más representada tras la OVX, y dentro de esta ruta aparecieron genes que ya habían sido asociados al metabolismo óseo previamente (ANEXO VI). Así, por ejemplo, los genes *Syk* y *Blnk* intervienen en la regulación de la diferenciación de los OCs induciendo las señales de RANK e ITAM (Shinohara *et al.* 2008), la sobre-expresión *in vivo* de *Ebfl* en OBs resulta en la supresión de la formación de hueso (Kiviranta *et al.* 2013), y el

gen *Marcks* es necesario para la regulación de la resorción ósea a través de la proteína quinasa C-delta (PKC $\delta$ ) (Cremasco *et al.* 2012). Todos estos genes se encuentran sobre-expresados tras la OVX, lo que es compatible con el aumento de pérdida ósea observado.

Además, resultaron significativos otros genes no incluidos en la regulación de células B, que también habían sido asociados previamente a fenotipos óseos. Así, por ejemplo, en un GWAS con replicación en dos cohortes independientes se encontraron los genes *Ibsp*, *Galnt3* y *Sox4* asociados a fenotipos óseos (Duncan *et al.* 2011). De la misma manera, los genes *Foxp1*, *PLcb1*, *Dpp4*, *Sox5*, *Mapk13* y *Clic5*, entre otros, se han propuesto como reguladores de la actividad de las células implicadas en la homeostasis ósea, en la cicatrización de fracturas y en la pérdida ósea bajo ciertas circunstancias, como la OVX (Le Mellay *et al.* 1997; Edwards *et al.* 2006; Kyle *et al.* 2011; Seo *et al.* 2011; Hojo *et al.* 2013; Zhang and Shively 2013). Cabe destacar el aumento de expresión de *CD40* tras la OVX. El mecanismo por el cual el sistema CD40/CD40L interviene en el metabolismo óseo no está completamente elucidado, pero se discutirá en profundidad en el apartado 5.2.

Tras el análisis de la expresión génica en ratón se analizó la asociación de cuatro genes a fenotipos óseos en la cohorte de mujeres postmenopáusicas. La selección de genes se realizó basándonos en nuestro conocimiento sobre la relevancia fisiológica de la función de cada gen en la homeostasis ósea.

Teniendo esto en cuenta, se eligieron dos genes infra-expresados (*GPX3*, e *IRAK3*) y dos genes sobre-expresados (*CD79A* e *IL7R*). Todos estos genes, excepto el gen *CD79A* se habían asociado previamente con el metabolismo óseo (Li *et al.* 2005; Sakamoto *et al.* 2005; Hartgring *et al.* 2009), aunque ninguno de estos genes se había incluido en estudios epidemiológicos de la osteoporosis. La elección de *CD79A* se basó en su papel dentro de vía de señalización de las células B (ANEXO VI y Figura 40). Los resultados de asociación a fenotipos óseos fueron significativos para los genes *GPX3* y *CD79A* (Tabla 28 y Tabla 29).

El gen *GPX3* codifica para la glutatión peroxidasa 3 sérica, un enzima que disminuye tanto en ratas hembra osteoporóticas envejecidas (Sakamoto *et al.* 2005), como en ratonas sometidas a OVX (el presente estudio). Este enzima interviene en la detoxificación del peróxido de hidrógeno por lo que es una barrera importante contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus consecuencias para la función celular. De hecho, es bien sabido que las ROS pueden contribuir al envejecimiento y a la osteoporosis como resultado de la marcada disminución de los antioxidantes plasmáticos que se produce con la edad tanto en mujeres como en hombres. Esto se debe a que la pérdida de estrógenos o andrógenos disminuye las defensas contra el estrés oxidativo en el hueso, lo que explica, en parte, el aumento de la resorción ósea cuando se instaura este hipogonadismo (Manolagas 2010).

En consecuencia, la disminución de *Gpx3* en la médula ósea de ratonas OVX observada en el presente estudio apoya la participación de este enzima en la pérdida ósea debido a la deficiencia de estrógenos y refuerza la importancia de las ROS en la homeostasis ósea. Independientemente, el *software* SNPStats asignó un bajo riesgo a los SNPs de este gen, por lo que no es probable que se trate de un polimorfismo funcional. Más bien, puede estar en desequilibrio de ligamiento con otras variantes del gen *GPX3* u otros genes causantes cercanos a la región, como *TNIP1* (proteína interactiva con TNFAIP3 1) que se ha asociado con patologías tales como artritis reumatoide, pero esto necesita un estudio en profundidad que aún no hemos realizado.

El otro gen que se asoció a fenotipos óseos en nuestra cohorte de mujeres fue *CD79A* (Tabla 28 y Tabla 29). La proteína que codifica, junto con *CD79B* es necesaria para la expresión y función del receptor de antígenos de células B (BCR). La unión de un antígeno al BCR provoca la endocitosis del antígeno, este antígeno se procesa y los péptidos resultantes se unen a las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHCII) para su presentación a células T  $CD4^+$ .

Se ha propuesto que, entre los mecanismos responsables de la pérdida ósea inducida por OVX, pueda encontrarse el aumento en la tasa de formación de OCs provocada por la expansión en médula ósea de células T productoras

de TNF. Esta expansión estaría producida, en parte, por un aumento en la presentación de antígenos debido a una expresión aumentada de la MHCII y en parte, por la estimulación de la producción de IL-7 e INF $\gamma$  y la disminución de TGF $\beta$  (Pacifci 2012b).

Una posible hipótesis para explicar esta pérdida ósea podría ser que variantes en la región cercana al gen *CD79A*, como el SNP rs1428922 localizado en el extremo cercano a 5' del gen *CD79A* u otras variantes en desequilibrio de ligamiento, puedan causar cambios en la expresión del gen. Esto estaría estrechamente relacionado con el proceso de presentación de antígenos, lo que se ha demostrado que confiere susceptibilidad a padecer osteoporosis. Sin embargo, es necesario un estudio con mayor profundidad, aumentando el número de SNPs estudiados, así como un análisis funcional de los polimorfismos asociados a fenotipos óseos.

Con este primer experimento traslacional quedó claro el papel crucial que tenía la célula B tras la ovariectomía, ya que la ruta de regulación de este tipo celular fue la más alterada en este proceso.

### Estudio de la OVX sobre la expresión génica de las células B de MO

Siguiendo la lógica, realizar un segundo estudio traslacional a partir de células B aisladas de médula ósea tras la ovariectomía se antojó como el paso siguiente para continuar esta investigación. Según nuestro conocimiento es la primera vez que se ha realizado un estudio de este tipo en esta subpoblación celular de médula ósea.

El estudio de comprobación mediante *microarrays* de las diferencias de expresión en las células B de médula ósea de ratonas OVX y SHAM se realizó según lo detallado en el apartado 3.5.1.1.

Al realizar el *microarray* de expresión se obtuvieron 2791 transcritos diferencialmente expresados entre ratonas OVX y SHAM, pertenecientes a 2621 genes anotados. De éstos, decidimos validar 16 genes por otras técnicas (MassARRAY-QGE y qPCR) y en este caso se consiguió un 100% de

reproducibilidad (Tabla 31), lo que apoya la robustez de los resultados obtenidos mediante el estudio usando los *microarrays*.

Al analizar los procesos biológicos en los que estaban implicados los genes diferencialmente expresados tras la OVX, destacaron procesos como la regulación de la transcripción, el transporte, procesos relacionados con el sistema inmune y la inflamación, fosforilación, apoptosis o la modificación de la cromatina (Tabla 30).

Cuando se agruparon los genes según las rutas PANTHER, se vio que las rutas obtenidas podían relacionarse estrechamente con la fisiopatología de la osteoporosis, como la inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas, la señalización de interleuquinas, la activación de la célula B, la señalización vía TGF- $\beta$ , la respuesta a estrés oxidativo y la vía de señalización Wnt (Weitzmann 2013).

Una vez analizadas las rutas implicadas, se seleccionaron 9 genes y se probó su asociación a fenotipos óseos en nuestra cohorte. Estos genes estaban entre las 26 familias génicas diferencialmente expresadas con la ovariectomía más significativas: regulación de la transcripción mediada por ADN (*Sox6*, *Hdac5*, y *Sox4*), respuesta inmune innata (*CD80* y *Tyrobp*), apoptosis (*Tnfrsf19*), respuesta inflamatoria (*Il18rap*) y regulación positiva de la apoptosis (*Mmp9*). Todos estos procesos se relacionan con fenotipos y/o procesos óseos (Koga *et al.* 2004b; Weitzmann and Pacifici 2006; Raggatt *et al.* 2008; Colnot *et al.* 2009; Bozec *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014). Así pues, el criterio de selección principal fue, por una parte, la replicación de asociaciones descritas previamente (*HDAC5*, *SOX4* y *SOX6*) y, para el resto de genes se seleccionaron aquellos cuya función biológica fuese relevante para la fisiología ósea.

Con respecto a la DMO, los SNPs en los genes *HDAC5* y *CD86* se encontraban significativamente asociados a DMOe-CF (Valor *P* nominal), mientras que el SNP del gen *CD80* se asoció a DMOe-CL (Tabla 32). El gen *HDAC5* se había asociado previamente a DMO-CF (Rivadeneira *et al.* 2009). Este gen codifica para una histona deacetilasa de clase II expresada



ubícuamente, responsable de la desacetilación de residuos de lisina de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. En hueso, el reclutamiento de HDAC5 es necesario para la diferenciación de OBs mediada por TGF- $\beta$  (Schroeder and Westendorf 2005), y se ha descrito que inhibe a MEF2C, un factor de transcripción crucial para la expresión de *SOST*, por lo que controla la expresión de esclerostina en osteocitos (Wein *et al.* 2015).

La asociación de variantes en los genes *CD80* y *CD86* a fenotipos óseos sí es un punto novedoso de este trabajo de Tesis Doctoral. Tanto CD80 (también llamado B7-1) como CD86 (B7-2) son proteínas que trabajan en tándem expresándose en las células presentadoras de antígeno para proveer de las señales co-estimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de la célula T. Se ha descrito que CD80 y CD86 inhiben la diferenciación de OCs (Bozec *et al.* 2014), por lo que los ratones deficientes para CD80/CD86 son osteopénicos, debido a un aumento en la diferenciación de OCs.

La interacción de CD80/CD86 con CTLA-4 induce la activación de la enzima IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) en precursores de OCs, lo que degrada el triptófano y promueve la apoptosis celular (Bozec *et al.* 2014). Además de esta función, existe expresión de *CD80/CD86* en OBs humanos cultivados, de modo que las variantes en estos genes podrían tener un efecto directo sobre los OBs (Reyes-Botella *et al.* 2000).

Cuando se calculó el riesgo de padecer osteoporosis utilizando la regresión logística ajustada por covariables, además de los genes citados (*CD80*, *CD86* y *HDAC5*), entraron en el modelo los SNPs de los genes *MMP9* y *SOX4* (Tabla 33).

El gen *SOX4* ya se había asociado a DMO en otras ocasiones (Duncan *et al.* 2011; Estrada *et al.* 2012). Este gen es miembro de la familia de factores de transcripción SOX, que participan en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular (Kamachi and Kondoh 2013). Con respecto al hueso, los ratones *Sox4*<sup>+/-</sup> muestran osteopenia y disminución del volumen óseo cortical y trabecular. Esta proteína parece

mediar los efectos posteriores de PTH y PTHrP en el desarrollo óseo (Nissen-Meyer *et al.* 2007).

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha detectado por primera vez la asociación de variantes del gen *MMP9* con un mayor riesgo de padecer osteoporosis, si bien ya se había establecido una asociación entre SNPs de este gen y la DMO en hombres (Yamada *et al.* 2004). La metalo-proteinasa de matriz 9 (MMP9) media la invasión vascular del callo cartilaginoso hipertrófico y se ha descrito que los ratones deficientes para MMP9 presentan defectos en las uniones de sus fracturas causadas por la persistencia del cartílago en el lugar de la fractura, lo que implica a este gen en la regulación de la diferenciación de células condrogénicas y osteogénicas durante las etapas iniciales de la reparación ósea (Colnot *et al.* 2009).

Además, en este trabajo analizamos la asociación de estos polimorfismos a la fractura por fragilidad, y dos de los genes se asociaron significativamente, *CD80* y *SOX6* (Tabla 34). Al igual que *SOX4*, *SOX6* es un miembro de la familia SOX de factores de transcripción, y junto con *SOX5*, se expresa en el cartílago y tiene un papel esencial en la diferenciación de los condrocitos, la formación de cartílagos y, por lo tanto, la formación ósea endocondral (Lefebvre *et al.* 1998). *SOX6* ya se había asociado en la literatura con DMO y obesidad (Liu *et al.* 2009; Rivadeneira *et al.* 2009), pero hasta este momento no se había asociado a fractura por fragilidad.

#### Estudio traslacional a partir del modelo celular humano

En el contexto de los estudios traslacionales a partir de modelos, la otra aproximación traslacional usada en este trabajo de Tesis Doctoral fue la determinación de la expresión diferencial a partir de cultivos primarios de OBs de pacientes fracturadas y osteoartéricas. El objetivo de este experimento fue el de detectar genes diferencialmente expresados en la fractura ósea con el fin de encontrar nuevos genes candidatos para estudios de asociación en la cohorte.

El análisis de los perfiles de expresión mediante *microarrays* se validó, al igual que en los estudios anteriores, mediante espectrometría de masas (MassARRAY-QGE Sequenom), consiguiendo un 71% de reproducibilidad, lo que validó los resultados obtenidos por el *array*.

El análisis de las rutas y procesos implicados en la fractura por fragilidad reveló como importantes la vía de señalización Wnt, con 18 genes implicados; la vía de señalización de la inflamación mediada por citoquinas, con otros 18 genes implicados; o la vía de señalización de las integrinas, con 16 genes, entre otras rutas (Figura 46).

Entre los genes destacables de la vía Wnt podemos encontrar a *CTNNB1* y *TBLIX*, genes que se han relacionado con osteoporosis y enfermedades óseas previamente (Hsu and Kiel 2012; García-Ibarbia *et al.* 2013). La ruta de Inflamación mediada por citoquinas fue una de las más representadas en la clasificación. Entre los genes pertenecientes a esta ruta podemos encontrar a *CCL13*, *RAF1* y *PF4*, los cuales han sido relacionados con enfermedades óseas en trabajos anteriores (Ekvall *et al.* 2011; Griffin *et al.* 2011; Lin *et al.* 2016). Además, detectamos 16 genes diferencialmente expresados implicados en la vía de señalización de integrinas, entre los que destacan *COL10A1*, e *ITGA4*, dos de los genes escogidos para la validación del *microarray*, y que están estrechamente relacionados con la formación ósea (Komori 2010b; Khurana *et al.* 2013). De esta forma, la clasificación funcional de los genes alterados reforzó la importancia de la inflamación (Pacifi 2013), la vía Wnt (Gaur *et al.* 2005; Velasco and Riancho 2008) o la vía de señalización de las integrinas (Rivadeneira *et al.* 2009) en los procesos de osteoporosis y fractura por fragilidad.

Una vez analizadas estas rutas se seleccionaron 4 genes, *CTNNB1*, *MEF2C*, *FOXC1* y *EBF2*, para analizar su posible asociación a fenotipos óseos en nuestra cohorte de mujeres. La elección de estos genes se basó en estudios previos que habían descrito la relación entre éstos y determinados fenotipos óseos.

El gen *CTNNB1* codifica para la proteína  $\beta$ -catenina que, tal como se ha visto, es esencial en la ruta canónica de la vía Wnt (Gaur *et al.* 2005) y por lo tanto en la regulación transcripcional (Chen *et al.* 2016; Ma *et al.* 2016). La importancia de este gen se ha manifestado también en su asociación con DMO (Rivadeneira *et al.* 2009) y Fractura (Estrada *et al.* 2012). El gen *MEF2C* había sido asociado con DMO (Velázquez-Cruz *et al.* 2014) y se ha relacionado con la regulación de Esclerostina vía regulación de HDAC5 en osteocitos (Wein *et al.* 2015). La elección de *FOXC1* se basó en que previamente se había relacionado con la diferenciación de los OBs (Mirzayans *et al.* 2012). El gen *EBF2*, el cual codifica un factor temprano de células B, no había sido relacionado con DMO anteriormente pero si se encuentra relacionado con células B (Qian *et al.* 2013), con OPG (Patiño-García *et al.* 2009) y con la diferenciación en OCs (Kieslinger *et al.* 2005).

Teniendo en cuenta la diferencia que existe en esta cohorte respecto a la edad entre las pacientes que pertenecen a cada uno de los grupos, se prestó especial atención al Valor Z, ya que este parámetro representa una normalización intrínseca de las edades de las pacientes incluidas en este estudio.

En el análisis ANOVA sin corregir por covariables se obtuvo una asociación clara del rs87939 del gen *CTNNB1* tanto a parámetros óseos de cadera como de columna (Tabla 38). Los demás polimorfismos no alcanzaron significación estadística para asumir la asociación, si bien la tendencia fue clara en el caso del SNP rs2745599 de *FOXC1* ( $P=0.087$  para el valor Z de CF y  $P=0.086$  para el Valor Z de CL), o en la asociación de rs1366594 de *MEFC2C* con el Valor Z de CF ( $P=0.059$ ).

En el análisis ANCOVA, corrigiendo por la variable IMC y agrupando los genotipos según el modelo de herencia, se determinó la asociación de los diferentes polimorfismos al parámetro Z. En el caso de *MEF2C*, el rs1366594 se asoció significativamente ( $P=0.021$ ) al valor Z de CF. En este caso las pacientes de genotipo AA mostraban mejor estado óseo que pacientes de genotipo AC/CC.

El SNP rs87939 del gen *CTNNB1* mostró asociación con el Valor Z en CF ( $P=0.010$ ) y CL ( $P=0.006$ ), revelándose que las mujeres de genotipo AA mostraban mejor estado óseo que aquellas que presentaban los otros dos genotipos. El hecho de que la asociación se dé tanto en cadera como en columna apoya la elección de este gen como candidato para su asociación a DMO (Ma *et al.* 2016), Fractura (Haffner-Luntzer *et al.* 2016) y Osteoporosis (Urano and Inoue 2014a).

Para el SNP rs2745599 de *FOXC1* no hubo asociación significativa con ninguno de los fenotipos óseos, si bien los resultados mostraban una clara tendencia a la asociación ( $P=0.102$  respecto al Valor Z cadera;  $P=0.108$  respecto al Valor Z columna), según la cual las mujeres de genotipo GG presentan un mejor estado óseo que las de otros genotipos.

Por último, el SNP rs1008974 de *EBF2* no mostró ninguna asociación significativa a los fenotipos óseos analizados, pero si se apreció una tendencia en el Valor Z de columna ( $P=0.094$ ), según la cual mujeres con genotipo AA tendrían un peor estado óseo en comparación con los otros genotipos.

El riesgo estimado de sufrir osteoporosis se calculó realizando un análisis de regresión logística. En este caso se utilizó el modelo de regresión “backward”, a partir del cual se van eliminando variables que no mejoran de manera significativa la calidad del modelo. La regresión logística binaria se calculó de acuerdo al modelo de herencia corregido por la variable IMC y se tuvo en cuenta el riesgo de padecer osteoporosis u osteopenia (*Odds ratio*) con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados del riesgo asociados a valores de cadera se muestran en la Tabla 40. De los SNPs estudiados en el análisis, solo el rs87939 de *CTNNB1* presentó un riesgo significativo de osteoporosis u osteopenia en cadera tras la corrección ( $P=0.008$ ), resultando que las mujeres de genotipo AG/GG tienen un riesgo 1.513 veces mayor de padecer osteoporosis u osteopenia en cadera que las de genotipo AA. Así, se relaciona una vez más al gen *CTNNB1* con osteoporosis y osteopenia.

Sin embargo, el hallazgo más importante del presente estudio es la posible asociación con DMO de los genes *MEF2C* y *FOXC1*, ya que resultan

asociaciones novedosas. Los SNPs rs1366594 (A>C) de *MEF2C* y rs2745599 (G>A) de *FOXCI* muestran una tendencia a su asociación con DMO, y en el caso de *MEF2C*, una clara asociación con el valor Z de cadera.

### 5.1.3. Estudios de funcionalidad de las variantes genéticas

#### Identificación de una posible expresión génica dependiente de alelo (EGDA): *CD40/CD40L*

Uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo ha sido estudiar la funcionalidad de los polimorfismos asociados a DMO. El primer elegido fue el SNP rs1883832 del gen *CD40* ya que este polimorfismo resultó asociado a fenotipos óseos de manera continuada (Pineda *et al.* 2008; Wagner *et al.* 2015). Para ello, lo primero que se buscó fue una posible expresión diferencial dependiente de alelo tanto por qPCR a tiempo real, como por secuenciación (Ge *et al.* 2005). La tasa de expresión génica obtenida por qPCR, tanto en OBs como en PBLs, reveló que las mujeres homocigotas para el alelo C (rs1883832) mostraron una expresión mayor del gen *CD40* en relación con aquellas con otro genotipo (CT en OBs y CT/TT en PBLs; Figura 47).

Respecto al gen *CD40L*, no detectamos expresión en OBs y los datos para PBLs fueron inconcluyentes, por lo que decidimos abordar este estudio desde otra aproximación, para tratar de determinar si existía expresión diferencial dependiente de alelo para el SNP rs1126535, del gen *CD40L* y también para el rs1883832 del gen *CD40*.

Dado que una de las limitaciones de este estudio fue la falta de mujeres homocigotas para ambos SNPs (TT para rs1883832 y CC para rs1126535) se decidió analizar el posible desequilibrio alélico (*allelic imbalance*) mediante secuenciación en un grupo de mujeres heterocigotas (CT) para ambos SNPs (ver Material y Métodos) (Ge *et al.* 2005). Este ensayo se basa en la secuenciación, tanto del ADN como del ADNc, para la región donde se sitúa el SNP en individuos heterocigotos con el fin de detectar desequilibrios en la

expresión de ambos alelos comparando los picos obtenidos en los electroferogramas de secuenciación.

Para el SNP rs1883832 de *CD40*, el ratio C/T para los ADNc superaba el máximo rango del intervalo de confianza del 95% (realizado a partir de ADNg de muestras heterocigotas) en el 87.5% de las casos, lo que implica que existe un desequilibrio alélico significativo favorable al alelo C. (apartado 4.3.1).

Estos datos eran similares a aquellos obtenidos por otro estudio para los mismos SNPs y están de acuerdo con una mayor expresión de la proteína CD40 en células B en individuos homocigotos para el alelo C (Jacobson *et al.* 2005). Sin embargo, nosotros detectamos en el presente trabajo diferencias a nivel transcripcional mientras que Jacobson y col. describen diferencias en cuanto a cantidad de proteína pero no a nivel transcripcional. No obstante, nuevos datos publicados apoyan nuestros hallazgos y muestran una menor transcripción del gen *CD40* en individuos CT/TT (Wagner *et al.* 2015).

Para el gen *CD40L* no encontramos ningún sesgo en la expresión de C/T para el SNP sinónimo rs1126535 por esta técnica, por lo que no se siguió analizando dicho SNP.

### Caracterización de la tasa de transcripción mediante ensayos de gen reportero

En este trabajo de Tesis Doctoral se realizaron ensayos de gen reportero con el objetivo de comprobar la funcionalidad de algunos de los SNPs que resultaron estar asociados a DMO, analizando la tasa de transcripción *in vitro* para cada alelo.

Respecto al gen *RUNX2*, se decidió probar la funcionalidad del polimorfismo rs7771980 (T>C), situado en la posición -1025 dentro de la región reguladora del promotor 2 (P2). Este polimorfismo se había asociado a DMO en estudios previos del grupo (Pineda *et al.* 2010). Doecke y col., por su parte, analizaron la funcionalidad de éste y otros SNPs de la región P2, concluyendo que sí existía una relación entre éstos y una mayor actividad del promotor de *RUNX2*, y que esta actividad aumentada, a su vez, se asociaba a una mayor DMO (Doecke *et al.* 2006).

Aunque nuestra pretensión para este SNP fue la de replicar los resultados obtenidos por este grupo, en nuestras condiciones los resultados no fueron

concluyentes, ya que al clonar el fragmento que contenía el alelo en el vector vacío no hubo un aumento significativo de la expresión, lo que hubiera sido lo esperable en caso de haber clonado una secuencia con actividad promotora. Al clonar nuestro fragmento en el vector que contiene el promotor, sí hubo un aumento de la expresión génica, pero no fue dependiente de alelo.

Una posible explicación para esta disparidad en los resultados es que la región que se decidió probar, que contenía el SNP citado, era mucho menor que la que se utilizó en el experimento de Doecke y col. (Doecke *et al.* 2006), lo cual apunta a que nosotros dejamos de clonar secuencias reguladoras importantes necesarias para el inicio de la transcripción.

Otro de los polimorfismos analizados mediante la técnica del gen reportero fue el SNP rs1428922 (G>A) situado a -1410 nt del gen *CD79A* obtenido del estudio traslacional realizado a partir de médula ósea total de ratonas ovariectomizadas. En este caso se decidió clonar los fragmentos que contenían los distintos alelos en los vectores promotor y control, ya que en un ensayo preliminar se comprobó que la clonación de esta secuencia inhibía la transcripción del gen de la luciferasa. Los resultados revelaron una disminución significativa de la expresión génica en ambos alelos con respecto al control ( $P=0.003$ ). El vector control posee tanto la región promotora del virus SV40 como un *enhancer* (activador o potenciador) de la transcripción, también del virus SV40. Nuestros resultados, por tanto, apuntan a que en la secuencia clonada existe una región de unión de un factor de transcripción inhibidor, ya que hay diferencias entre la expresión del vector vacío y al clonar cualquiera de los alelos, pero además, hay una inhibición significativamente mayor el caso del alelo G que en el A ( $P=0.009$ ).

Por tanto, estos datos sugieren que alrededor de la secuencia donde se encuentra el SNP rs1428922 del gen *CD79A*, se une un factor de transcripción inhibidor de la expresión. La proteína CD79A es necesaria para la maduración de las células B, de manera que este SNP podría estar directamente implicado en este proceso. Las mujeres de genotipo AA para este polimorfismo presentaban un valor de DMO inferior, tanto en cadera como en columna, que las mujeres de otros genotipos, por lo que quizá el factor inhibidor se expresa de manera más eficiente en las pacientes con genotipo GG, lo que podría



proteger contra la pérdida ósea vía estimulación de la maduración de células B.

Respecto al gen *CD40*, se clonó una región que contenía los SNPs rs1800686 (G/A) y rs752118 (C/T) de la región 5' del gen con el objetivo de explicar el desequilibrio alélico detectado. Para ello se buscaron elementos reguladores potenciales que modificaran la tasa de transcripción en función del haplotipo (A-T/G-C) mediante un ensayo de gen reportero.

La ausencia de diferencias entre los dos haplotipos respecto a la tasa de transcripción, sugiere que las variantes genéticas en la región 5' de *CD40* no pueden explicar el desequilibrio alélico detectado en este gen, es decir, que no existen factores de transcripción actuando en *trans* trabajando de manera diferencial en ambos haplotipos cuando se transfectaron ambas construcciones en células eucariotas, por lo que se deberían buscar elementos actuando en *cis* para explicar este desequilibrio alélico.

En cualquier caso, dado que los estudios *in vitro* pueden presentar artefactos que modifican las condiciones que se están dando *in vivo*, y teniendo en cuenta que al clonar estamos limitándonos a un fragmento restringido de la potencial región reguladora, los resultados de estos estudios han de ser tomados con cautela.

#### Cuantificación del grado de metilación de islas CpG en la región promotora del gen *CD40*

Una limitación importante de los estudios de gen reportero es que al amplificar los fragmentos mediante PCR, el ADN pierde su perfil de metilación y, teniendo en cuenta que una de las posibles causas del desequilibrio alélico puede ser las marcas epigenéticas diferenciales depositadas en la cromatina de un modo dependiente de alelo (Pastinen 2004), decidimos estudiar el grado de metilación de islas CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción del gen *CD40*.

En el presente trabajo se detectaron 8 CpGs diferencialmente metiladas de un total de 20 (7 de 20 al corregir por variables múltiples) entre mujeres de alta y baja DMO. Por lo general, las mujeres con menor masa ósea

presentaron mayor metilación en 6 de estos 8 sitios CpG (Tabla 42 y Figura 58).

Dado que la metilación de ADN en general se asocia a menores tasas de transcripción génica (Feinberg 2007), la metilación diferencial observada entre estos dos grupos de mujeres podría explicar una mayor o menor transcripción del gen de *CD40* y, en consecuencia, mayor o menor nivel de OPG, respectivamente. Ésta es una posibilidad que requiere un mayor estudio porque se ha descrito que la activación de CD40 con un anticuerpo anti-CD40 o bien con la proteína recombinante CD40L, induce la producción de OPG (Li *et al.* 2007a). Este hallazgo apoya la hipótesis de que las mujeres TT (N=6) para rs1883832, tiendan a presentar menor DMO y un nivel de OPG más bajo (Tabla 23 y Tabla 24), y que a su vez tengan menor expresión de CD40 (Jacobson *et al.* 2005). Además, las mujeres con baja masa ósea (con mayoría de mujeres de genotipo TT) muestran mayores tasas de metilación en 6 de las 8 CpGs significativas (Tabla 42) que las mujeres de alta masa ósea (en su mayoría mujeres de genotipo CC).

Se ha descrito que el diferente grado de metilación en las CpG puede afectar a la tasa de transcripción génica porque la metilación de la citosina influye directamente a la afinidad de los factores de transcripción, modificando sus sitios de unión (Tate and Bird 1993). Se ha determinado experimentalmente que estos sitios de unión a factores de transcripción (SUFTs) muestran usualmente niveles de metilación de ADN bajos, y es que, como regla general, la unión de los factores de transcripción a estos sitios se da normalmente en ausencia de metilación (Straussman *et al.* 2009; Thurman *et al.* 2012). Esto se ha descrito en numerosas ocasiones, por ejemplo, la metilación de la *E-box*, que previene la unión de n-Myc a los promotores de los genes *EGFR* y *CASP8*, o la metilación del sitio de unión YY1 en el promotor del gen *Peg3*, que reprime la unión de YY1 (Kim *et al.* 2003; Perini *et al.* 2005), entre otros ejemplos.

Para buscar SUFTs en la secuencia que contenía nuestros dos amplicones solapantes (Figura 57) se utilizó el *software* PATCH (<http://www.gene-regulation.com/>). El *software* detectó SUFTs en las CpGs diferencialmente metiladas, para la proteína aislante de la cromatina CTCF (CpG 1-6,

secuencia: GCTGC), para el factor de transcripción Sp1 (CpG 2-4.5, secuencia: CCGCG), para el factor represor GCF (CpG 2-4.5, secuencia: CTCCTGCGC), y para el factor de transcripción STAT1 (CpG 2-22, secuencia: TTCCCGGAA).

Aunque es imposible sacar conclusiones en este sentido sin llevar a cabo experimentos adicionales, las moléculas CTCF y GCF son reguladores importantes de la expresión génica y los factores de transcripción SP1 y STAT1 ya han sido relacionados con la regulación del gen *CD40* (Nguyen and Benveniste 2000; Tone *et al.* 2002). Así pues, esta metilación diferencial entre mujeres de alta y baja masa ósea podría tener consecuencias funcionales en la expresión de *CD40*.

## **5.2. Papel del sistema CD40/CD40L en la homeostasis ósea y su implicación en la producción de OPG por parte de la célula B en médula ósea**

La importancia del sistema CD40/CD40L tanto en la respuesta inmune como en el sistema óseo está ya fuera de toda duda. Son muchas las evidencias que apoyan este rol fundamental de este sistema en la regulación de la homeostasis ósea; se ha descrito que ratones *knocked out* para *CD40* y *CD40L* tienen osteoporosis y una menor producción de OPG (Li *et al.* 2007a); que los niños afectados por el síndrome de hiper-IgM, causado por mutaciones en el gen de *CD40L* muestran osteopenia (Lopez-Granados *et al.* 2007); y también que ratones que carecen del gen *CD40L* están protegidos de la pérdida ósea inducida por la administración continua de PTH o bien por la ovariectomía, ya que el aumento de células T asociado a estos procesos induce la señalización a través de CD40/CD40L lo que activa señales pro-osteoclastogénicas (Li *et al.* 2007a, 2011, Gao *et al.* 2008, 2009).

El papel de la célula B en la producción de OPG es un aspecto que no está exento de controversia. Efectivamente, se había descrito que CD40 era capaz de estimular la producción de OPG por parte de las células B (Yun *et al.* 1998). En 2007 el grupo de Li y col. describió a las células B como los

mayores productores de OPG en la médula ósea, y según este estudio, esta producción se veía aumentada en respuesta a la activación de CD40 (Li *et al.* 2007a). Además, describieron que las células B pueden ser responsables de las concentraciones elevadas de OPG durante el envejecimiento, por lo que tienen un papel fundamental para contrarrestar la excesiva reabsorción ósea asociada a la edad, atribuyendo a la pérdida de células B, que se da con la edad, la disminución de OPG y la pérdida ósea (Li *et al.* 2014a).

Sin embargo, estos resultados no han sido corroborados por otros grupos, de hecho se ha publicado que ratones deficientes en células B maduras sufren una pérdida de masa ósea idéntica con respecto a ratones control tras la ovariectomía, por lo que las células B maduras no serían mediadores centrales de la pérdida ósea inducida por la ovariectomía *in vivo* (Li *et al.* 2007b). Horowitz y col., publicaron que ratones deficientes en  $\mu$ MT, que carecen de células B maduras, no presentaban un fenotipo óseo evidente y que por el contrario, los ratones con deficiencia en OPG tienen un fenotipo óseo con aumento del espesor cortical y un aumento en la actividad osteoclástica en el hueso cortical (Horowitz *et al.* 2010).

La identificación del papel de la célula B en la producción de OPG ha supuesto un objetivo importante de este trabajo y en este sentido realizamos la serie de experimentos que constituyen el bloque de estudio del efecto del anticuerpo activador de CD40 sobre la producción de OPG.

En nuestros experimentos *in vivo*, comprobamos en varias ocasiones que el anticuerpo anti-CD40 administrado a la ratona, reducía significativamente en todos los casos los niveles de OPG en suero y que esta disminución no se producía al administrar su control isotópico (Figura 59). Esta reducción del nivel de OPG resultó ser dependiente de dosis, por lo que los resultados sugieren que la administración intraperitoneal de este anticuerpo reduce el nivel de producción de OPG en el suero de las ratonas. Además, esta disminución se mantenía en el tiempo ya que al cultivar las células de la médula ósea de estos animales, encontramos una reducción de la producción de OPG a cualquier dosis de anticuerpo (Figura 60). En este punto se comprobó la producción de OPG en cultivos de células de bazo (órgano con un alto porcentaje de células B), así como en células B CD19<sup>+</sup> obtenidas a

partir de médula ósea total. En ambos tipos de cultivo no se detectó producción de OPG en sobrenadante. Estos datos sugieren de manera muy evidente que las células B podrían no ser responsables de la producción de OPG, al menos bajo las condiciones experimentales seleccionadas, esto es, el subgrupo de células B CD19<sup>+</sup> aisladas de médula ósea o células de bazo.

Respecto a los experimentos en los que se comprobó el efecto de la administración del anticuerpo *in vitro*, el ensayo en MC3T3-E1 nos permitió comprobar que esta línea celular de osteoblastos de ratón produce OPG de manera constitutiva. Este es el motivo por el cual estas células no son un buen modelo para detectar diferencias debidas a la adición de un anticuerpo activador, pues las diferencias entre condiciones y tratamientos no aportan datos claros ni se puede inferir una tendencia evidente, al estar el sistema saturado.

Los cultivos de células de la médula ósea reprodujeron los resultados obtenidos *in vivo*, produciéndose una disminución significativa del nivel de OPG en el sobrenadante dosis-dependiente, mientras que los cultivos de células de bazo no produjeron OPG en ninguna de las condiciones, de la misma manera que las células B CD19<sup>+</sup>, lo que refuerza nuestros resultados anteriores, demostrando que este subtipo celular no produce OPG, contrariamente a lo que se había publicado. La viabilidad de estos cultivos fue comprobada mediante citometría de flujo (Figura 64).

En definitiva, nuestros experimentos *in vivo* e *in vitro* cuestionan seriamente que la célula B produzca OPG, al menos al nivel descrito por el grupo de Li (Li *et al.* 2007a), e incluso disponemos de datos (células B CD19<sup>+</sup>, células de bazo, etc), que ponen en cuestión que la célula B produzca OPG. Clarificar esto sería determinante dado el papel de la célula B en la homeostasis ósea y cardiovascular.

### **5.3. Caracterización e identificación de nuevos biomarcadores indicadores del riesgo de fractura por fragilidad**

A pesar de que, a día de hoy, la determinación de la DMO mediante absorciometría dual de rayos X es el mayor predictor de riesgo de fractura, ésta es una técnica lenta, ya que lleva de 1 a 2 años de monitorización establecer la progresión de la enfermedad (Gluer 1999). Esto hace que el uso de marcadores del estado óseo sea de vital importancia en la predicción del riesgo de fractura y también para monitorizar el efecto de las terapias.

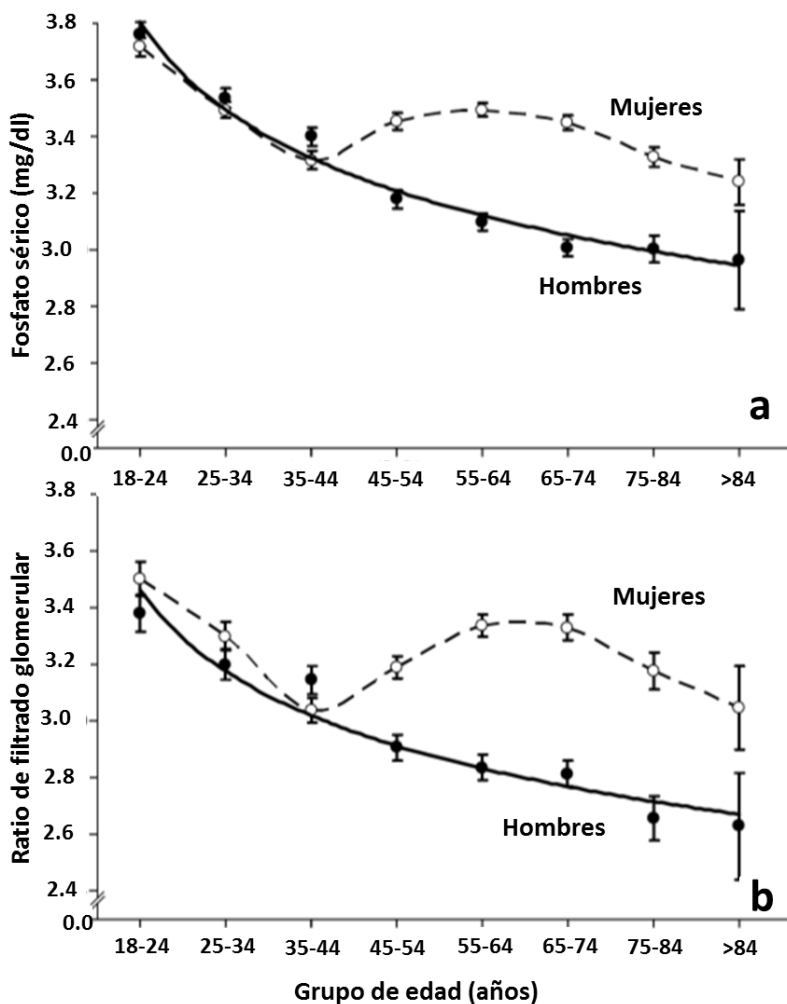
Un objetivo muy importante de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido, por una parte caracterizar la fractura por fragilidad y por otra encontrar biomarcadores predictivos del riesgo de fractura. En nuestro estudio, dada la diferencia de edad entre ambos grupos, las pacientes del grupo Fractura mostraron peores parámetros óseos, en especial a nivel del cuello femoral (Tabla 43), y niveles de marcadores de remodelado óseo más elevados como el CTx y la osteocalcina, así como un nivel más elevado de fosfato.

Al tratar de caracterizar los biomarcadores asociados al riesgo de fractura mediante regresión lineal, se detectó el fosfato y HDL como las variables con mayor capacidad predictiva de fractura ósea de cadera debido a fragilidad, junto con la edad y la DMO. La importancia de este hallazgo es indudable, debido a que éstos son parámetros analizados rutinariamente en las analíticas, y, al menos en nuestro estudio, han conseguido desplazar de las ecuaciones de los modelos de regresión a variables específicas de remodelado óseo que son conocidos predictores del riesgo de fractura tales como la fosfatasa alcalina, tanto total como ósea, la osteocalcina o el CTx, establecido como uno de los marcadores de referencia para los estudios de osteoporosis (Garnero 2017).

Se ha descrito que niveles bajos de HDL están asociados con el desarrollo de un microambiente inflamatorio que afecta a la diferenciación y función de los osteoblastos (Papachristou *et al.* 2017), lo que se correspondería con un nivel de formación ósea disminuido y por tanto una tendencia a la fractura. En nuestro caso las pacientes fracturadas presentan niveles más bajos de HDL (Tabla 44), lo que se correspondería con esta hipótesis.

Las concentraciones sanguíneas de fósforo son significativamente más altas en los primeros años de la vida y disminuyen progresivamente con la edad, aunque en mujeres sufren un aumento transitorio durante la menopausia

(Figura 70a). Los niveles de fosfato sérico se relacionan con la función renal, acumulándose fosfato cuando ésta es deficiente. Los niveles máximos de filtrado glomerular se corresponden con los niveles normales de fosfato (Figura 70b).



**Figura 70.** Relación entre el fosfato sérico y la reabsorción renal del fosfato con la edad. **(a)** Nivel de fosfato sérico en mujeres y hombres en función del grupo de edad. **(b)** Ratio máxima de filtrado glomerular, calculado como reabsorción tubular, en relación con el grupo de edad [modificado de (Cirillo *et al.* 2008)].

El fosfato sérico se ha asociado al riesgo de fractura en un estudio reciente en una cohorte de más de 5000 pacientes. En este estudio encontraron que los niveles de fosfato sérico se asocian a fractura independientemente del sexo y DMO. Estos resultados sugieren que un aumento en el nivel de fosfato, incluso dentro del rango de la normalidad, puede ser perjudicial para la calidad ósea de la población sin fallo renal (Campos-Obando *et al.* 2017).

En nuestro estudio el grupo Fractura presentó valores significativamente más altos de fosfato sérico, contrariamente a lo esperado por las diferencias en la edad entre los grupos (Tabla 44).

La edad o la insuficiencia renal están asociados a variaciones en los niveles de fosfato. En concreto, la insuficiencia renal deriva en una acumulación de fosfato, por lo que se comprobó la función renal calculando el CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*), que estima índice de filtrado glomerular infiriendo el estado renal de nuestras pacientes.

Está establecido que por debajo de un CKD-EPI menor de 45 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> se comienza a tener sintomatología leve de insuficiencia renal. Datos más recientes sitúan este umbral en 58 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, entendiendo que este es el nivel mínimo en el que se tiene constancia que no están actuando las hormonas que actúan a nivel renal modificando los niveles del fosfato y otros minerales (Isakova *et al.* 2011). Teniendo en cuenta este umbral, se eliminaron las pacientes que se encontraban por debajo y se realizó de nuevo el análisis de regresión logística, obteniéndose prácticamente la misma significación estadística para las variables descritas (datos no mostrados), por lo que los datos sugieren que las diferencias en los niveles de fosfato sérico pueden ser atribuibles al estado de fragilidad propio de la fractura y por tanto puede tenerse en cuenta como predictor, lo cual coincidiría con otro trabajo el reciente (Campos-Obando *et al.* 2017).

Las diferencias en los ELISAs se muestran en la Tabla 45. Como se puede observar, los niveles para OPG, Osteocalcina e ICTP resultaron significativamente diferentes entre grupos. Estas variables no se usaron como covariables en los estudios de regresión debido a que se determinaron en un pequeño grupo de la población, por lo que el tamaño muestral resultaba insuficiente para tal fin.



La significación estadística obtenida en las diferencias entre grupos para la osteocalcina ( $P=0.014$ ), no hace sino reforzar los datos obtenidos en el análisis bioquímico, demostrando que existe un mayor nivel de esta proteína en las pacientes fracturadas. Este resultado es algo sorprendente, ya que la osteocalcina es un conocido marcador de formación ósea y el hecho de que esté aumentado podría deberse al profundo desequilibrio que existe en la homeostasis ósea hacia la resorción, que puede estar llevando al organismo a intentar compensar esta resorción aumentando la formación de nuevo hueso.

La OPG se encontró significativamente aumentada en las pacientes fracturadas ( $P=0.032$ ), lo que podría estar apoyando el hecho de que el metabolismo óseo esté más activo en estas pacientes. Este nivel aumentado de OPG favorece el bloqueo de la vía RANK/RANKL, lo que inhibe la maduración de los OCs, favoreciéndose la formación de hueso.

El ICTP no es sino un fragmento liberado de la lisis del colágeno tipo I en ciertas enfermedades que cursan con deficiencias en el hueso, si bien el ICTP no se produce como fruto de la resorción ósea fisiológica mediada por catepsina-K, y está, por tanto, menos afectado por la menopausia que por patologías que cursen con lisis ósea. No obstante, decidimos usarlo para completar el estudio, por la importancia que tiene el colágeno tipo I en la microarquitectura ósea. Como podemos observar en la Tabla 45, los valores para este parámetro fueron significativamente distintos entre grupos ( $P=0.011$ ), estando aumentados los niveles en el grupo de pacientes fracturadas.

Si bien el uso de los marcadores bioquímicos clásicos de remodelado óseo, derivados de enzimas o colágeno es fundamental (Garnero 2014), éstos desafortunadamente exhiben un alto grado de variabilidad, lo que supone una limitación substancial para su uso como herramienta clínica (Seibel 2005). Por este motivo, en esta Tesis Doctoral uno de los objetivos fue encontrar biomarcadores séricos alternativos que informaran del riesgo de la fractura por fragilidad.

En este contexto, los miRNAs están posicionándose como biomarcadores válidos en muchas patologías, principalmente como resultado de su estabilidad y facilidad de detección. Esta estabilidad se ha atribuido a su

encapsulación en microvesículas en suero o plasma (Cortez and Calin 2009). Además, los marcadores clásicos determinan por lo general los niveles del metabolismo final (p. e. CTx). Sin embargo, los miRNAs, debido a su especificidad, pueden indicar el proceso celular y molecular afectado, lo que puede dirigir a una mejor elección terapéutica.

Al diseñar el experimento se tuvo en cuenta que las pacientes usadas como controles en el estudio hubieran sufrido una intervención lo más similar posible a nuestras pacientes de fractura, por lo que se escogieron mujeres que necesitaron un reemplazo de su cadera por una prótesis debido a una coxartrosis, lo que redujo la variabilidad entre grupos.

Otra fortaleza del estudio fue intentar determinar un biomarcador en suero, debido a la accesibilidad del mismo y su facilidad de extracción en el caso de su posible aplicación en clínica.

Tal como se ha detallado en el apartado 3.8.1, se evitó el uso de suero hemolizado en la fase de elaboración del perfil, pero se decidió incluir un porcentaje de sueros hemolizados en la etapa de validación para comprobar su efecto. El hecho de los miRNAs con expresión diferencial detectados en suero no estuvieran afectados por la hemólisis puede suponer una gran ventaja en la práctica clínica, donde la obtención de sueros hemolizados no es infrecuente.

Se han descrito los miRNAs miR-122-5p, miR-125b-5p, y miR-21-5p como preferencialmente expresados en suero de mujeres que han sufrido fractura de cadera debido a fragilidad con respecto a sueros de mujeres control. Mediante el análisis ROC se concluyó que estos tres miRNAs son biomarcadores valiosos para distinguir pacientes con fractura por fragilidad de controles, y podrían incluso llegar a ser marcadores para uso clínico, especialmente el miR-21-5p.

Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados en otro estudio (Seeliger *et al.* 2014), aunque el diseño experimental no fue el mismo. Este grupo estudió una población de pacientes fracturados, clasificándolos en osteoporóticos o no en función de los resultados densitométricos. En este estudio detectaron 15 miRNAs significativamente sobre-expresados en pacientes osteoporóticos, 9 de ellos en suero (miR-21, miR-23a miR-93, miR-

100, miR-122a, miR-124a, miR-125b, y miR-148a) y 6 en tejido óseo (miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100, and miR-125b miRNAs).

Los tres miRNAs sobre-expresados en el suero de las pacientes fracturadas del presente trabajo aparecen en la lista de los 9 miRNAs de suero (miR-122-5p, miR-125b-5p, y miR-21-5p). De hecho, la sensibilidad y especificidad de estos tres miRNAs (Figura 67) era muy similar, incluso mejor, que aquellos del estudio de Seeliger y col., lo que indica que estos tres miRNAs pueden distinguir entre los pacientes con fractura ósea aquellos con osteoporosis (Seeliger *et al.* 2014), así como los pacientes de fractura ósea de los controles osteoartóricos.

En este punto, tenemos que mencionar el comportamiento de miR-125b-5p. El nivel de miR-125b-5p en el estadio de elaboración del perfil fue mayor en los controles (Figura 67), mientras que en el estadio de validación los niveles fueron mayores en los pacientes del grupo Fractura (Figura 68), lo que está de acuerdo con datos previos (Seeliger *et al.* 2014). Esto subraya la necesidad de validación, en muestras individuales, de los resultados de elaboración del perfil.

En otro estudio (Garmilla-Ezquerria *et al.* 2015), se describió la expresión diferencial de 13 miRNAs (valor  $P$  nominal  $<0.05$ ) entre OBs primarios de pacientes de fractura y controles osteoartóricos. Este estudio trató de replicar los valores de miR-210, ya que había sido asociado con la actividad osteoblástica en muestras de hueso humano en un estudio reciente (Mizunoa *et al.* 2009), si bien no encontraron significación estadística para el estadio de validación. En este estudio se usaron los mismos controles que el nuestro, si bien realizaron el ensayo en cultivos de OBs y no en suero. A pesar de esta diferencia se obtuvo un resultado similar para miR-210 ( $P=0.078$  en nuestro estudio) (Figura 67).

Además, la correlación detectada en nuestro estudio entre los niveles de miR-210 y la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina ( $r=0.52$ ,  $P=0.007$ ) sugiere la posible función osteoblástica de este miRNA.

En contraste con los resultados de nuestro trabajo y los de Seeliger y col., hay una publicación reciente en que se analizan miRNAs en plasma de mujeres postmenopáusicas chinas (clasificadas como normales/ osteopénicas/

osteoporóticas). En este trabajo, Li y col., detectaron tres miRNAs diferencialmente expresados entre estos grupos de mujeres (miR-21, miR-133a, y miR-146a), con los niveles más altos en el grupo control (Li *et al.* 2014b).

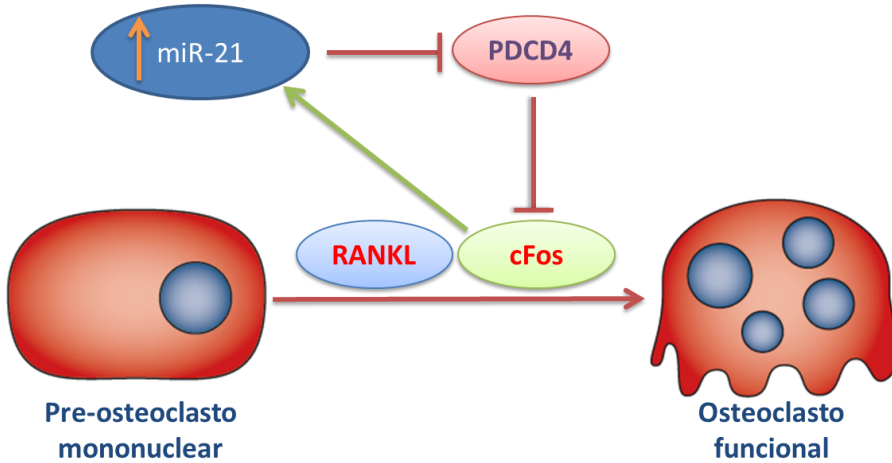
Aunque los tres estudios citados se llevaron a cabo en poblaciones diferentes, y los tamaños muestrales son pequeños, es difícil conciliar los resultados de Li con los de Seeliger y los del presente trabajo. Existen, no obstante, pruebas convincentes que asocian el miR-21-5p con la función osteoclástica. Así, la Figura 69, que muestra la correlación entre los niveles de CTx y miR-21-5p, refleja su participación en osteoclastogénesis.

De hecho, miR-21-5p es uno de los pocos miRNAs, junto con miR-223 y miR-155, que están directamente relacionados con diferenciación osteoclástica (Lian *et al.* 2012). En este estudio se buscaron miRNAs sobre-expresados por inducción de la vía RANKL durante la diferenciación de células mono a multinucleadas. En este ensayo se comprobó que RANKL induce la expresión de miRNA-21-5p, lo que disminuye el nivel de proteína PDCD4, un inhibidor de c-Fos, por lo miR-21-5p elimina la represión de c-Fos, en una mecanismo de *feedforward*, dado que c-Fos induce la expresión de miR-21-5p, lo que conduce a la diferenciación osteoclástica (Figura 71) (Sugatani *et al.* 2011).

Por tanto, estos estudios sugieren que miR-21-5p es un miRNA pro-osteoclastogénico, y curiosamente, su sobre-expresión durante la osteoclastogénesis está antagonizada por los estrógenos (Sugatani and Hruska 2013).

Respecto a los otros miRNAs, miR-122-5p está asociado con enfermedades de tejido conectivo y miR-125b-5p está involucrado en la regulación de la osteoblastogénesis. De hecho, miR-125b, que está regulado positivamente en el suero de pacientes con fractura por fragilidad, inhibe la osteoblastogénesis regulando negativamente la proliferación celular. En células mesenquimales murinas ST2, la expresión de miR-125b-5p se encuentra reducida tras el tratamiento celular con BMP-4. Además, miR-125b tiene un efecto negativo en la diferenciación osteoblástica porque su

sobreexpresión disminuye la actividad de la fosfatasa alcalina (Mizuno et al. 2008).



**Figura 71.** Regulación de miR-21-5p de la diferenciación osteoclástica [modificada de (Lian *et al.* 2012)].

#### 5.4. Limitaciones de los estudios

Los experimentos y ensayos de este trabajo de Tesis Doctoral no están exentos de limitaciones. En este apartado se intenta detallar, en la medida de lo posible, las limitaciones generales que hemos encontrado en los distintos estudios.

Respecto a las poblaciones de estudio, a pesar de tener un número de integrantes considerable, en ensayos a gran escala en que se pretende estudiar un número elevado de polimorfismos es necesario tener cohortes muy grandes para alcanzar un poder estadístico considerable, debido a las limitaciones que impone la comparación por variantes múltiples. No obstante, en todos los estudios realizados en este Trabajo la potencia estadística fue muy buena, a pesar de la limitación del tamaño muestral.

En la conformación de la cohorte de fractura viene intrínseca la limitación de la obtención de unos controles adecuados para emparejar los casos. Se tomó la decisión de elegir a pacientes osteoartíticas debido a la posibilidad de tener acceso a la muestra de cuello femoral y poder tener cultivos de OBs primarios como control, ya que estas pacientes también requieren cirugía de reemplazo. El problema fundamental es la edad que presentan las pacientes fracturadas ( $79.9 \pm 8.6$ ), que requieren intervención de urgencia sea cual sea su edad, en contraposición con las pacientes osteoartríticas, que suelen presentar problemas mucho antes, con lo que la cirugía se programa en una edad más temprana ( $69.2 \pm 9.6$ ). Esta diferencia es significativa ( $P < 0.001$ ) y es posible que produzca algún sesgo en los resultados, de ahí que la corrección por edad haya sido completamente necesaria en todos los estudios realizados en esta cohorte.

Otra peculiaridad en este trabajo de Tesis Doctoral ha sido el distinto tamaño muestral en cada estudio. Por lo general, se utilizaron todas las muestras disponibles en cada momento, que tuvieran asociados todos los datos densitométricos y antropométricos pertinentes. Como las cohortes no son estáticas y están en continuo crecimiento, los datos recopilados para ciertas pacientes han podido aumentar entre estudios y éstas han podido ser incluidas entre las muestras seleccionadas para estudios posteriores.

La traslación de resultados a partir de estudios de análisis multigénico realizados en modelos animal y celular ha supuesto un pilar fundamental de este trabajo, pero la metodología ha variado entre ellos en función de las necesidades. El uso de la ratona OVX como modelo se ha justificado suficientemente, pero realizar el sacrificio transcurrido un mes desde la intervención obvia los cambios que se dan en los primeros días post-OVX, que son los principales cambios que afectan al metabolismo (García-Pérez *et al.* 2006a; c). No obstante, la elección de este momento para el sacrificio está justificada a fin de evitar los cambios en la expresión génica debido a la inflamación de la propia cirugía. Además, el modelo resulta más similar al de mujeres 5-10 años después de la menopausia.

A nivel técnico, en estos estudios se usaron aproximaciones diferentes, y es que en el estudio traslacional a partir de médula ósea total se usaron *pools*

de muestras y en el estudio posterior realizado con las células B CD19<sup>+</sup> se usaron muestras individuales. El objetivo de realizar los *pools* a partir de MO total fue minimizar los pasos entre el sacrificio de animales y la obtención de ARN con el objetivo de que éste fuera de la más alta calidad, además de incluir a un número mayor de animales optimizando los recursos económicos. Una vez optimizada la técnica, y habiendo comprobado la importancia de la célula B, se decidió apostar por este tipo celular, realizando el ensayo en muestras individuales.

Respecto al estudio de *microarrays* que se realizó en el ensayo traslacional a partir de modelo celular de cultivos primarios de osteoblastos humanos, quizá la limitación principal ha sido la imposibilidad de realizar el ensayo con muestras de ARN obtenidas directamente del hueso tras la intervención. La decisión de realizar el ensayo con cultivos de osteoblastos se basó en la calidad de las muestras, ya que el ARN obtenido del hueso no alcanzaba la calidad suficiente para un ensayo de este tipo, que necesita una calidad óptima del ARN.

La traslación de los resultados a pacientes se llevó a cabo en muestras de la cohorte DMO, que está compuesta por mujeres caucásicas, fundamentalmente postmenopáusicas, por lo que no está claro si los resultados pueden ser extrapolados a mujeres de diferente origen étnico o a pacientes masculinos. Además, no se dispuso de información sobre los hábitos dietéticos y/o actividad física de los participantes.

Para evitar falsos positivos, sin embargo, se ha analizado una población de una región geográfica particular, descartándose subestructuras y se han utilizado covariables en el análisis estadístico y un test de correcciones múltiples para disminuir el riesgo de Error tipo I relacionado con la cantidad de SNPs analizados en algunos ensayos. Por lo tanto, aunque se ha tratado de evitar sesgos potenciales, es posible que algunos hayan podido permanecer. Se necesitan más estudios en diferentes cohortes para aclarar estas cuestiones y para evaluar la importancia real de nuestros hallazgos respecto a las asociaciones de SNPs a fenotipos óseos.

En el estudio de asociación de SNPs en los genes *CD40/CD40L*, encontramos la limitación de la falta de determinados genotipos para ambos

SNPs. En este sentido suplimos esta falta de genotipos agrupando las mujeres según el modelo de herencia para cada SNP.

Otra limitación de este ensayo es que nos hemos centrado en el estudio de los procesos transcripcionales y no se ha estudiado el efecto de los SNPs en la traducción proteica.

### **5.5. Perspectivas futuras**

El estudio de las bases genéticas de la osteoporosis, y en general de las enfermedades multifactoriales complejas, es un campo de trabajo que no deja de sorprendernos con nuevas aproximaciones y nuevos hallazgos que, por lo general, a la vez que resuelven un problema, abren el campo de estudio a otros muchos nuevos aspectos.

En nuestro caso, los estudios incluidos en este trabajo de Tesis Doctoral han sugerido nuevas vías de regulación de la homeostasis ósea hasta ahora inexploradas, aumentando, aún más si cabe, el ya de por sí nutrido campo de estudio. En este sentido el grupo tiene como objetivo principal continuar con la identificación de genes y polimorfismos asociados a los fenotipos óseos, explorando las rutas propuestas por los experimentos con modelos traslacionales. Asimismo, es fundamental describir la funcionalidad de los polimorfismos descritos, para corroborar su implicación real en el desarrollo de los fenotipos, y ser capaces de establecer la implicación de cada uno de ellos a nivel proteico.

Nuestras aportaciones al campo de la Osteoinmunología, caracterizando el sistema CD40/CD40L, así como la contribución para esclarecer el papel de la célula B en la producción de OPG, suponen pasos adelante en la caracterización de la interacción de estos sistemas, y proponen explicaciones plausibles de qué está ocurriendo en el nicho de la médula ósea. Una posibilidad es establecer nuevos estudios caracterizando diferentes subpoblaciones de células B con el objetivo de esclarecer el papel de cada subtipo celular en la producción de OPG.

La incorporación de nuevas pacientes a ambas cohortes continúa siendo un objetivo fundamental, ya que el aumento del tamaño de la cohorte conlleva



un aumento del poder estadístico de los estudios, lo que revierte en asociaciones más precisas e importantes. De la misma manera, en la medida de lo posible, es fundamental recopilar más datos de las mujeres de las cohortes, haciendo una labor de investigación a nivel administrativo, ya que encontrar un nuevo dato puede ser crucial a la hora de escoger a una paciente en un ensayo futuro.

Esta Tesis Doctoral ha encabezado los estudios en el campo de la Epigenética en nuestro laboratorio, tanto con el estudio de funcionalidad de un SNP la región promotora del gen *CD40* mediante cuantificación del grado de metilación de los sitios CpG, como con el estudio de miRNAs expresados en la fractura por fragilidad.

En el caso del estudio de miRNAs se han aportado resultados prometedores que justifican la continuación de los estudios, de manera que se va a proceder a caracterizar en mayor profundidad el estado de las pacientes en el momento en que se produce la fractura. Una posibilidad es aumentar el tamaño muestral, comprobando el poder diagnóstico de miR-21 entre pacientes con fractura por fragilidad y pacientes sanos de la misma edad, e incluso establecer un ensayo longitudinal estableciendo el riesgo de fractura según este nuevo biomarcador. En cualquier caso, las posibilidades son múltiples, y todas pasan por una buena caracterización del paciente fracturado, para establecer parámetros capaces de predecir fractura y mejorar el estado de fragilidad asociado al envejecimiento.



## 6. CONCLUSIONES



1. En la replicación en nuestra cohorte de la asociación de tres polimorfismos funcionales descritos previamente, se consiguió replicar los resultados del SNP rs312009 situado en el gen *LRP5*, y parcialmente los del SNP rs4876869 en el gen *TNFRSF11B*. Específicamente, las mujeres de genotipo CC para el SNP del gen *LRP5* mostraron un riesgo de osteoporosis en columna lumbar 2.82 veces mayor que el resto de mujeres. Nuestros resultados subrayan la importancia del gen *LRP5* en el metabolismo óseo y enfatizan en la necesidad de la replicación de resultados previos en cohortes independientes.
  
2. Se aportan varias evidencias de la implicación del sistema CD40/CD40L en la regulación de la homeostasis ósea. Estas evidencias son:
  - a. Se ha confirmado la asociación de SNPs en el gen *CD40L* a DMO de columna lumbar. Esta confirmación no ha sido posible en el caso del gen *CD40* debido a la imposición de los tests para comparaciones múltiples en los estudios en los que se incluyen varios SNPs.
  
  - b. Las mujeres homocigotas para el alelo T del SNP rs1883832 del gen *CD40* muestran una tendencia muy fuerte, a tener menor masa ósea en ambas localizaciones esqueléticas. Estas mismas mujeres muestran también una clara tendencia a tener niveles más bajos de OPG, que fue significativa al comparar los niveles de OPG en mujeres de los cuartiles extremos de DMO. Estos menores niveles de OPG en mujeres de este genotipo podría explicar, al menos en parte, su menor DMO.
  
  - c. En el presente trabajo se describe un desequilibrio alélico en el SNP rs1883832 del gen *CD40*, siendo el alelo C el más expresado, tanto en linfocitos de sangre periférica, como en osteoblastos primarios.
  
  - d. Se ha detectado una metilación diferencial de varios sitios CpG alrededor de SNP rs1883832 del gen *CD40* entre las mujeres de alta y baja DMO. Las mujeres con menor DMO tienen una mayor metilación global de estos sitios CpGs.
  
  - e. Todos estos datos sugieren fuertemente que una menor producción de OPG en las mujeres TT para el rs1883832 del gen *CD40* podría ser la

causa de su menor DMO. Esta menor producción de OPG podría ser consecuencia de una menor expresión de *CD40* detectada en este trabajo para el alelo T como consecuencia de la metilación diferencial detectada.

3. En el presente trabajo describimos dos enfoques traslacionales diferentes con el fin de identificar genes candidatos para el estudio en el humano. Ambos han proporcionado abundante información sobre rutas implicadas en la regulación de la homeostasis ósea. El modelo animal consistió en la comparación de la expresión génica global en médula ósea total (o células B purificadas) entre ratonas sometidas o no a la ovariectomía. El modelo celular consistió en la comparación de la expresión génica global en osteoblastos primarios de mujeres fracturadas y mujeres controles osteoartríticas. Hallazgos relevantes de este bloque son:
  - a. El análisis de las rutas diferencialmente expresadas tras la ovariectomía en médula ósea total sitúa a la vía de regulación de la célula B como la ruta más importante. Cuando se analizó la expresión génica global en células B, las rutas más alteradas fueron inflamación, señalización de interleuquinas, respuesta al estrés oxidativo y vía Wnt, entre otras.
  - b. Se ha descrito una asociación a DMO de dos genes diferencialmente expresados por la ovariectomía en el ratón, *CD79A* y *GPX3*. En el presente trabajo se ha detectado una disminución en la expresión del gen de la luciferasa cuando se clonó la región que contenía al SNP rs1428922 del gen *CD79A*. Aunque la disminución se dio en ambos alelos, ésta es más acusada para el alelo G. Este polimorfismo podría ser funcional al unir algún factor de transcripción inhibidor de la transcripción.
  - c. Esta es la primera vez que se describe la asociación de SNPs en los genes *CD80*, *CD86* y *MMP9* a fenotipos óseos en mujeres posmenopáusicas. Estos genes fueron diferencialmente expresados en la célula B tras la ovariectomía.

- d. El ensayo traslacional realizado a partir de osteoblastos primarios reveló la importancia de rutas como la inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas y de nuevo por la vía Wnt. Se describió también la asociación del SNP rs87939 del gen *CTNNB1* y del SNP rs1366594 del gen *MEF2C* a DMO.
  
4. Con respecto a la funcionalidad del sistema CD40/CD40L en la homeostasis ósea, la administración intraperitoneal de un anticuerpo activador de CD40 disminuyó los niveles séricos de OPG de manera dosis-dependiente, así como la producción de esta proteína por parte de las células de médula ósea. Además, no se ha detectado la producción de OPG en cultivos de células B CD19+ aisladas de médula ósea, ni en cultivos de células de bazo, tanto a nivel de expresión génica como de proteína. Estos resultados ponen en cuestión el papel de la célula B como productora de OPG y hacen necesaria una revisión del tema.
  
5. Con respecto a la caracterización del fenotipo fractura ósea por fragilidad, nuestros resultados señalan como predictores de riesgo a los niveles séricos de fosfato y HDL junto con parámetros tan relevantes para este fenotipo como la edad o la DMO, desplazando de los modelos estadísticos a parámetros clásicos tales como el CTx o la propia edad, lo que da una idea de su capacidad predictiva.
  
6. En el presente trabajo se describen varios microRNAs diferencialmente expresados en osteoblastos primarios de mujeres con fractura de cadera por fragilidad. De los analizados, 3 de ellos podrían convertirse en biomarcadores de este fenotipo, miR-122-5p, miR-125-5p y miR-21-5p. Específicamente, el microRNA miR-21-5p muestra una fuerte correlación con los niveles de CTx en nuestra población, lo cual representa una nueva evidencia de su relación con la osteoclastogénesis.





## 7. BIBLIOGRAFIA



- Agueda L., Bustamante M., Jurado S., Garcia-Giralt N., Ciria M., Saló G., *et al.*, 2008 A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **23**: 1954–1963.
- Agueda L., Velázquez-Cruz R., Urreiziti R., Yoskovitz G., Sarrión P., Jurado S., *et al.*, 2011 Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: Novel Involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J. Bone Miner. Res.* **26**: 1133–1144.
- Ahuja S. S., Zhao S., Bellido T., Plotkin L. I., Jimenez F., Bonewald L. F., 2003 CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. *Endocrinology* **144**: 1761–1769.
- Alonso N., Ralston S. H., 2014 Unveiling the mysteries of the genetics of osteoporosis. *J. Endocrinol. Invest.* **37**: 925–934.
- Arboleya L., Castañeda S., 2013 Osteoimmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reum. Clin* **9**: 303–315.
- Armstrong A. P., Tometsko M. E., Glaccum M., Sutherland C. L., Cosman D., Dougall W. C., 2002 A RANK / TRAF6-dependent Signal Transduction Pathway Is Essential for Osteoclast Cytoskeletal Organization and Resorptive Function. *J. Biol. Chem.* **277**: 44347–44356.
- Arron J. R., Choi Y., 2000 Bone versus immune system. *Nature* **408**: 535–536.
- Baldock P. A., Eisman J. A., 2004 Genetic determinants of bone mass. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**: 450–456.
- Barnett V., Lewis T., 1994 *Outliers in Statistical Data*. Wiley, New York.
- Barrett J. C., Fry B., Maller J., Daly M. J., 2005 Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**: 263–265.
- Bartel D. P., 2004 MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**: 281–297.
- Benjamini Y., Hochberg Y., 1995 Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple. *J. R. Stat. Soc.* **57**: 289–300.
- Berdasco M., Esteller M., 2010 Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev. Cell* **19**: 698–711.
- Bird A., 2002 DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6–21.
- Blake G. M., Fogelman I., 2009 The clinical role of dual energy X-ray absorptiometry. *Eur. J. Radiol.* **71**: 406–414.
- Blankenberg S., Rupprecht H. J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., *et al.*, 2003 Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* **107**: 1579–1585.

- Bliuc D., Nguyen N. D., Milch V. E., Nguyen T. V, Eisman J. A., Center J. R., 2009 Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA* **301**: 513–21.
- Bonde M., Qvist P., Fledelius C., Riis B. J., Christiansen C., 1994 Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin. Chem.* **40**: 2022–2025.
- Bonewald L. F., 2011 The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26**: 229–238.
- Boyle W. J., Simonet W. S., Lacey D. L., 2003 Osteoclast differentiation and activation. *Nat. Rev. Genet.* **423**: 337–342.
- Bozec A., Zaiss M. M., Kagwiria R., Voll R., Rauh M., Chen Z., *et al.*, 2014 T Cell Costimulation Molecules CD80 / 86 Inhibit Osteoclast Differentiation by Inducing the IDO / Tryptophan Pathway. *Sci. Transl. Med.* **6**: 1–10.
- Bracken C. P., Scott H. S., Goodall G. J., 2016 A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **17**: 719–732.
- Bradford M. M., 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brookes E., Shi Y., 2014 *Diverse epigenetic mechanisms of human disease.*
- Bucay N., Sarosi I., Dunstan C. R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., *et al.*, 1998 osteoprotegerin -deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *GENES Dev.* **12**: 1260–1268.
- Bush W. S., Moore J. H., 2012 Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput. Biol.* **8**: 1–11.
- Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., *et al.*, 2002 Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15524–9.
- Campos-Obando N., Koek W. N. H., Hooker E. R., Eerden B. C. van der, Pols H. A., Hofman A., *et al.*, 2017 Serum Phosphate Is Associated With Fracture Risk: The Rotterdam Study and MrOS. *J. Bone Miner. Res.* **32**: 1–12.
- Cano A., Dapía S., Noguera I., Pineda B., Hermenegildo C., Del Val R., *et al.*, 2008 Comparative effects of 17 $\beta$ -estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos. Int.* **19**: 793–800.
- Cauley J. A., Lui L.-Y., Ensrud K. E., Zmuda J. M., Stone K. L., Hochberg *et al.*, 2005 Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *Jama* **293**: 2102–2108.

- Cenci S., Weitzmann M. N., Roggia C., Namba N., Novack D., Woodring J., *et al.*, 2000 Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J. Clin. Invest.* **106**: 1229–1237.
- Charles P., Poser J. W., Mosekilde L., Jensen F. T., 1985 Estimation of Bone Turnover Evaluated by <sup>47</sup>Ca-Kinetics. *J. Clin. Invest.* **76**: 2254–2258.
- Chen X., Kuja-Halkola R., Rahman I., Arpegard J., Viktorin A., Karlsson R., Hagg S., *et al.*, 2015 Dominant genetic variation and missing heritability for human complex traits: Insights from twin versus genome-wide common SNP models. *Am. J. Hum. Genet.* **97**: 708–714.
- Chen L., Wu Y., Wang Y., Sun L., Li F., 2016 The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Sci. Rep.* **6**: 29176.
- Chuaqui R. F., Bonner R. F., Best C. J. M., Gillespie J. W., Flaig M. J., Hewitt S. M., *et al.*, 2002 Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.* **32 Suppl**: 509–514.
- Cirillo M., Ciacci C., De Santo N. G., 2008 Age, renal tubular phosphate reabsorption, and serum phosphate levels in adults. *N. Engl. J. Med.* **359**: 864–6.
- Clarke B., 2008 Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**: 131–139.
- Cohen Jr. M. M., 2006 The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates. *Am. J. Med. Genet. A* **140A**: 2646–2706.
- Colin E. M., Uitterlinden A. G., Meurs J. B. J., Bergink A. P., Klift M. Van De, Fang Y., *et al.*, 2003 Interaction between vitamin D receptor genotype and estrogen receptor  $\alpha$  genotype influences vertebral fracture risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 3777–3784.
- Colnot C., Thompson Z., Miclau T., Werb Z., Helms J. A., 2009 Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* **130**: 4123–4133.
- Cortez M. A., Calin G. A., 2009 MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin. Biol. Ther. Expert Opin. Biol. Ther.* **96**: 703–711.
- Cremasco V., Decker C. E., Stumpo D., Blackshear P. J., Nakayama K. I., Nakayama K., *et al.*, 2012 PKC $\delta$  Deficiency Perturbs Bone Homeostasis by Selective Uncoupling of Cathepsin K Secretion and Ruffled Border Formation in Osteoclasts. *J Bone Min. Res* **12**: 2452–2463.
- Dallas S. L., Bonewald L. F., 2010 Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. *Ann N Y Acad.Sci.*: 437–443.
- Daniel F. I., Cherubini K., Yurgel L. S., Figueiredo M. A. Z. De, Salum F. G., 2011 The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* **117**: 677–687.
- Delgado-Calle J., Garmilla P., Riancho J. A., 2012 Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr. Genomics* **13**: 252–263.

- Doecke J. D., Day C. J., Stephens A. S., Carter S. L., Daal A. van, Kotowicz M. A., *et al.*, 2006 Association of Functionally Different RUNX2 P2 Promoter Alleles With BMD. *J. Bone Miner. Res.* **21**: 265–273.
- Duncan E. L., Brown M. A., 2010 Genetic Determinants of Bone Density and Fracture Risk--State of the Art and Future Directions. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: 2576–2587.
- Duncan E. L., Danoy P., Kemp J. P., Leo P. J., McCloskey E., Geoffrey C., *et al.*, 2011 Genome-Wide Association Study Using Extreme Truncate Selection Identifies Novel Genes Affecting Bone Mineral Density and Fracture Risk. *Plos Genet.* **7**: 1–10.
- Edwards J. C., Cohen C., Xu W., Schlesinger P. H., 2006 C-Src control of chloride channel support for osteoclast HCl transport and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **281**: 28011–28022.
- Ehrich M., Nelson M. R., Stanssens P., Zabeau M., Liloglou T., Xinarianos G., *et al.*, 2005 Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 15785–90.
- Ekvall S., Hagen L., Allanson J., Bondeson M., 2011 Co-Occurring SHOC2 and PTPN11 Mutations in a Patient With Severe / Complex Noonan Syndrome-Like Phenotype. *Am. J. Med. Genet. A*: 1217–1224.
- Elgueta R., Benson M. J., Vries V. C. De, Noelle R. J., 2009 Molecular mechanism and function of CD40 / CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* **229**: 152–172.
- Estrada K., Styrkarsdottir U., Evangelou E., Hsu Y.-H., Duncan E. L., Ntzani E. E., *et al.*, 2012 Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat. Genet.* **44**: 491–501.
- Feinberg A. P., 2007 Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**: 433–440.
- Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I., Alobera Gracia M. A., Canto Pingarrón M. Del, Blanco Jerez L., 2006 Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **11**: 92–98.
- Fuhr B., Dunstan C. R., Seibel M. J., 2003 Markers of bone remodeling in metastatic bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 5059–5075.
- Franz-Odenaal T., Hall B., Witten P. E., 2006 Buried alive : How osteoblasts become osteocytes Buried Alive : How Osteoblasts Become Osteocytes. *Dev. Dyn.* **235**: 176–190.
- Friedman R. C., Farh K. K. H., Burge C. B., Bartel D. P., 2009 Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**: 92–105.

- Gao Y., Wu X., Terauchi M., Li J.-Y., Grassi F., Galley S., *et al.*, 2008 T Cells Potentiate PTH-Induced Cortical Bone Loss through CD40L Signaling. *Cell Metab.* **8**: 132–145.
- Gao Y., Wu X., Terauchi M., Li J., Grassi F., Yang X., *et al.*, 2009 T cells potentiate PTH induced cortical bone loss through CD40L signaling. *Cell Metab.* **8**: 132–145.
- García-Ibarbia C., Delgado-Calle J., Casafont I., Velasco J., Arozamena J., Pérez-núñez M. I., *et al.*, 2013 Contribution of genetic and epigenetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene* **532**: 165–172.
- García-Pérez M. Á., Noguera I., Hermenegildo C., Martínez-Romero A., Tarín J. J., Cano A., 2006a Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum. Reprod.* **21**: 880–887.
- García-Pérez M.Á., Pineda B., Cano A., 2006b Pérdida ósea posmenopáusica: estudio del polimorfismo genético y efecto de la administración de fitoestrógenos sobre los marcadores de metabolismo óseo. *Patol. del Apar. Locomot.* **4**: 271–280.
- García-Pérez M.Á., Del Val R., Noguera I., Hermenegildo C., Pineda B., Martínez-Romero A., *et al.*, 2006c Estrogen Receptor Agonists and Immune System in Ovariectomized Mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* **19**: 807–819.
- Garmilla-Ezquerria P., Sañudo C., Delgado-Calle J., Pérez-Nuñez M. I., Sumillera M., Riancho J. A., 2015 Analysis of the bone MicroRNome in osteoporotic fractures. *Calcif. Tissue Int.* **96**: 30–37.
- Garnero P., 2014 New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* **66**: 46–55.
- Garnero P., 2017 The Utility of Biomarkers in Osteoporosis Management. *Mol. Diagnosis Ther.*: 1–18.
- Gauderman W. J., 2002 Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am. J. Epidemiol.* **155**: 478–484.
- Gaur T., Lengner C. J., Hovhannisyan H., Bhat R. A., Bodine P. V. N., Komm B. S., *et al.*, 2005 Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **280**: 33132–33140.
- Ge B., Gurd S., Gaudin T., Dore C., Lepage P., Harmsen E., *et al.*, 2005 Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res.* **15**: 1584–91.
- George J. A., Micklesfield L. K., Norris S. A., Crowther N. J., 2014 The association between body composition, 25(OH)D, and PTH and bone mineral density in black African and Asian Indian population groups. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**: 2146–54.
- Ghayor C., Weber F. E., 2016 Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.

- Giedraitis V., He B., Huang W., Hillert J., 2001 Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J. Neuroimmunol.* **112**: 146–152.
- Gluer C. C., 1999 Monitoring skeletal changes by radiological techniques. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1952–1962.
- Goldstein D. B., Cavalleri G. L., 2005 Understanding human diversity. *Nature* **437**: 1241–1242.
- Gong Y., Vikkula M., Boon L., Liu J., Beighton P., Ramesar R., *et al.*, 1996 Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am. J. Hum. Genet.* **59**: 146–51.
- Gong Y., Slee R. B., Fukai N., Rawadi G., Roman-Roman S., Reginato A. M., *et al.*, 2001 LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell* **107**: 513–523.
- Gordon C. M., Bachrach L. K., Carpenter T. O., Karsenty G., Rauch F., 2004 Bone health in children and adolescents. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* **34**: 226–242.
- Grey A., Mitnick M. A., Masiukiewicz U., Sun B. H., Rudikoff S., Jilka R. L., *et al.*, 1999 A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* **140**: 4683–4690.
- Griffin J. W., Hopkinson W. J., Lassen M. R., Thethi I., Litinas E., Fareed J., 2011 Assessment of HIT Antibody Complex in Hip Fracture Patients Receiving Enoxaparin or Unfractionated Heparin. *Clin. Appl. Thromb.* **17**: 567–571.
- Guil S., Esteller M., 2009 DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 87–95.
- Hadjidakis D. J., Androulakis I. I., 2006 Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**: 385–396.
- Haffner-Luntzer M., Kemmler J., Heidler V., Prystaz K., Liedert A., 2016 Inhibition of Midkine Augments Osteoporotic Fracture Healing. *PLoS One* **11**: 1–12.
- Halleen J. M., Karp M., Viloma S., Laaksonen P., Hellman J., Kakonen S. M., *et al.*, 1999 Two-site immunoassays for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase based on characterization of six monoclonal antibodies. *J. Bone Min. Res* **14**: 464–469.
- Han X., Kawai T., Eastcott J. W., Taubman M. A., 2006 Bacterial-Responsive B Lymphocytes Induce Periodontal Bone Resorption. *J. Immunol.* **176**: 625–631.
- Hanahan D., 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.



- Hans D. B., Kanis J. A., Baim S., Bilezikian J. P., Binkley N., Cauley J. A., *et al.*, 2011 Joint Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and International Osteoporosis Foundation on FRAX®. *J. Clin. Densitom.* **14**: 171–180.
- Harada S., Rodan G., 2003 Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**: 349–355.
- Hardy J., Singleton. A., 2009 Genomewide Association Studies and Human Disease. *N Engl J Med* **360**: 1759–1768
- Hartgring S., Van Roon J., Van Wijk M., Jacobs K., Jahangier Z., Willis C. R., *et al.*, 2009 Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**: 2595–2605.
- He L., Hannon G. J., 2004 MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 522–531.
- Hendrickx G., Boudin E., Van Hul W., 2015 A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**: 1–14.
- Henriksen K., Neutzsky-Wulff A. V., Bonewald L. F., Karsdal M. A., 2009 Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* **44**: 1026–1033.
- Hermoso de Mendoza M. T., 2003 Classification of osteoporosis: Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* **26**: 29–52.
- Hernlund E., Svedbom A., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., *et al.*, 2013 Osteoporosis in the European Union: Medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch. Osteoporos.* **8**: 1–115.
- Hlaing T. T., Compston J. E., 2014 Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem* **51**: 189–202.
- Hofbauer L. C., Lacey D. L., Dunstan C. R., Spelsberg T. C., Riggs B. L., Khosla S., 1999 Interleukin-1beta and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not Interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* **25**: 255–259.
- Hojo H., Ohba S., Taniguchi K., Shirai M., Yano F., Saito T., *et al.*, 2013 Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J. Biol. Chem.* **288**: 9924–9932.
- Hoppman N., McLenithan J., McBride D. J., Shen H., Bruder J., Bauer R. L., *et al.*, 2010 A Common Variant in Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1 (FGFBP1) is Associated with Bone Mineral Density and Influences Gene Expression In Vitro. *Bone* **47**: 272–280.

- Horowitz M. C., Fretz J. A., Lorenzo J. A., 2010 How B cells influence bone biology in health and disease. *Bone* **47**: 472–479.
- Hsu Y. H., Kiel D. P., 2012 Genome-wide association studies of skeletal phenotypes: What we have learned and where we are headed. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**: 1958–1977.
- Hui S. L., Gao S., Zhou X. H., Johnston C. C., Lu Y., Glüer C. C., *et al.*, 1997 Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1463–1470.
- Ioannidis J. P. A., Ntzani E. E., Trikalinos T. A., Contopoulos-Ioannidis D. G., 2001 Replication validity of genetic association studies *John. Nat. Genet.* **29**: 306–309.
- Isakova T., Wahl P., Vargas G., Gutiérrez O. M., Scialla J., Xie H., *et al.*, 2011 FGF23, PTH and Phosphorus Metabolism in the Chronic Renal Insufficiency Cohort. *Kidney Int* **79**: 1370–1378.
- Jacobson E. M., Concepcion E., Oashi T., Tomer Y., 2005 A graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology* **146**: 2684–2691.
- Jin H., Van Hof R. J., Albagha O. M. E., Ralston S. H., 2009 Promoter and intron 1 polymorphisms of COL1A1 interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**: 2729–2738.
- Johnson M. L., Gong G., Kimberling W., Recker S. M., Kimmel D. B., Recker R. B., 1997a Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 1326–1332.
- Johnson M. L., Gong G., Kimberling W., Recker S. M., Kimmel D. B., Recker R. R., 1997b Linkage of a Gene Causing High Bone Mass to Human Chromosome 11 (11q12-13). *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 1326–1332.
- Kahn M., 2014 Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**: 513–32.
- Kamachi Y., Kondoh H., 2013 Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**: 4129–4144.
- Kanis J. A., Oden A., Johnell O., Laet C. De, Jonsson B., Oglesby A. K., 2003 The components of excess mortality after hip fracture. *Bone* **32**: 468–473.
- Kanis J. A., Burlet N., Cooper C., Delmas P. D., Reginster J. Y., Borgstrom F., *et al.*, 2008a European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* **19**: 399–428.
- Kanis J. A., Johnell O., Oden A., Johansson H., McCloskey E., 2008b FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos. Int.* **19**: 385–397.
- Kanis J. A., McCloskey E. V., Johansson H., Cooper C., Rizzoli R., Reginster J. Y., 2013 European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* **24**: 23–57.

- Katagiri T., Takahashi N., 2002 Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* **8**: 147–159.
- Kearns A. E., Khosla S., Kostenuik P. J., 2008 Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr. Rev.* **29**: 155–192.
- Kendzierski C. M., Zhang Y., Lan H., Attiea D., 2003 The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* **4**: 465–477.
- Khosla S., Oursler M. J., Monroe D. G., 2012 Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**: 576–581.
- Khurana S., Buckley S., Schouteden S., Ekker S., Petryk A., Delforge M., *et al.*, 2013 A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin- alpha 4 expression. *Blood* **121**: 781–790.
- Kiel D. P., Demissie S., Dupuis J., Lunetta K. L., Murabito J. M., Karasik D., 2007 Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med. Genet.* **8 Suppl 1**: S14.
- Kieslinger M., Folberth S., Dobрева G., Dorn T., Croci L., Erben R., *et al.*, 2005 EBF2 Regulates Osteoblast-Dependent Differentiation of Osteoclasts. *Dev. Cell* **9**: 757–767.
- Kim J., Kollhoff A., Bergmann A., Stubbs L., 2003 Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 233–245.
- Kirschner M. B., Kao S. C., Edelman J. J., Armstrong N. J., Valley M. P., van Zandwijk N., *et al.*, 2011 Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* **6**.
- Kiviranta R., Yamana K., Saito H., Ho D. K., Laine J., Tarkkonen K., *et al.*, 2013 Coordinated transcriptional regulation of bone homeostasis by Ebf1 and Zfp521 in both mesenchymal and hematopoietic lineages. *J. Exp. Med.* **210**: 969–85.
- Knothe M. L., Adamson J. R., Tami A. E., Bauer T. W., 2004 The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 1–8.
- Koga T., Inui M., Inoue K., Kim S., 2004a Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**: 758–763.
- Koga T., Inui M., Inoue K., Kim S., Suematsu A., Kobayashi E., *et al.*, 2004b Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**: 758–763.
- Komori T., 2010a Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* **658**: 43–50.
- Komori T., 2010b Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* **339**: 189–195.

- Kong Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H., Timms E., Capparelli C., *et al.*, 1999 OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**: 315–323.
- Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T., 2010 Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* **101**: 2087–2092.
- Kramer I., Baertschi S., Halleux C., Keller H., Kneissel M., 2012 Mef2c Deletion in Osteocytes Results in Increased Bone Mass. *J. Bone Miner. Res.* **27**: 360–373.
- Krzyszinska J. Y., Wei W., Huynh H., Jin Z., Wang X., Chang T.-C., *et al.*, 2014 miR-34a Blocks Osteoporosis and Bone Metastasis by Inhibiting Osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* **512**: 431–435.
- Kubota T., Michigami T., Ozono K., 2009 Wnt signaling in bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* **27**: 265–271.
- Kyle K. A., Willett T. L., Baggio L. L., Drucker D. J., Grynaps M. D., 2011 Differential Effects of PPAR- $\gamma$  Activation versus Chemical or Genetic Reduction of DPP-4 Activity on Bone Quality in Mice. *Endocrinology* **152**: 457–467.
- Lee S.-K., Lorenzo, J A., 1999 Parathyroid Hormone Stimulates TRANCE and Inhibits Osteoprotegerin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Murine Bone Marrow Cultures: Correlation with Osteoclast-Like Cell Formation. *Endocrinology* **140**: 3552–3561.
- Lee S.-K., Kadono Y., Okada F., Jacquin C., Koczon-Jaremko B., Gronowicz G., *et al.*, 2006 T Lymphocyte-Deficient Mice Lose Trabecular Bone Mass With Ovariectomy. *J. Bone Miner. Res.* **21**: 1704–1712.
- Lefebvre V., Li P., De Crombrughe B., 1998 A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**: 5718–5733.
- Li H., Cuartas E., Cui W., Choi Y., Crawford T. D., Ke H. Z., *et al.*, 2005 IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J. Exp. Med.* **201**: 1169–1177.
- Li Y., Toraldo G., Li A., Yang X., Zhang H., Qian W.-P., *et al.*, 2007a B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* **109**: 3839–3848.
- Li Y., Li A., Yang X., Weitzmann M. N., 2007b Ovariectomy-induced bone loss occurs independently of B cells. *J. Cell. Biochem.* **100**: 1370–1375.
- Li W. F., Hou S. X., Yu B., Li M. M., Ferec C., Chen J. M., 2010 Genetics of osteoporosis: Accelerating pace in gene identification and validation. *Hum. Genet.* **127**: 249–285.
- Li Y., Tawfeek H., Bedi B., Yang X., Adams J., Gao K. Y., *et al.*, 2011 Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 768–773.

- Li Y., Terauchi M., Vikulina T., Roser-Page S., 2014a B Cell Production of Both OPG and RANKL is Significantly Increased in Aged Mice. *Open Bone J.* **6**: 8–17.
- Li H., Wang Z., Fu Q., Zhang J., 2014b Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* **19**: 553–556.
- Li G., Thabane L., Papaioannou A., Ioannidis G., Levine M. A. H., Adachi J. D., 2017 An overview of osteoporosis and frailty in the elderly. *BMC Musculoskelet. Disord.*: 1–5.
- Lian J. B., Stein G. S., van Wijnen A. J., Stein J. L., Hassan M. Q., Gaur T., *et al.*, 2012 MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* **8**: 212–227.
- Lin F., Xue D., Xie T., Pan Z., 2016 HMGB1 promotes cellular chemokine synthesis and potentiates mesenchymal stromal cell migration via Rap1 activation. *Mol. Med. Rep.*: 1283–1289.
- Liu Y., Pei Y., Liu J., Yang F., Guo Y., Zhang L., *et al.*, 2009 Powerful Bivariate Genome-Wide Association Analyses Suggest the SOX6 Gene Influencing Both Obesity and Osteoporosis Phenotypes in Males. *PLoS One* **4**: 1–8.
- Liu Y.-J., Zhang L., Papasian C. J., Deng H.-W., 2014 Genome-wide Association Studies for Osteoporosis: A 2013 Update. *J Bone Metab* **21**: 99–116.
- Lopez-Granados E., Temmerman S. T., Wu L., Reynolds J. C., Follmann D., Liu S., *et al.*, 2007 Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 5056–5061.
- Lorenzo J., Horowitz M., Choi Y., 2008 Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. *Endocr. Rev.* **29**: 403–440.
- Lu Y., Fuerst T., Hui S., Genant H. K., 2001 International Original Article Standardization of Bone Mineral Density at Femoral Neck , Trochanter and Ward ' s Triangle. *Osteoporos. Int.* **12**: 438–444.
- Luis T. C., Weerkamp F., Naber B. A. E., Baert M. R. M., Haas E. F. E. De, Nikolic T., *et al.*, 2009 Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* **113**: 546–554.
- Ma C., Shuai B., Shen L., Yang Y. P., Xu X. J., Li C. G., 2016 Serum carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 level in postmenopausal women : correlation with  $\beta$  -catenin and bone mineral density. *Osteoporos. Int.* **27**: 1529–1535.
- Maniopoulos C., Sodek J., Melcher A. H., 1988 Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* **254**: 317–330.

- Manolagas S. C., 2000 Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**: 115–137.
- Manolagas S. C., 2010 From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **31**: 266–300.
- Manolio T. A., Collins F. S., Cox N. J., Goldstein D. B., Hindorff L. A., Hunter D. J., *et al.*, 2009 Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **8**: 747–753.
- Martín-Subero J. I., Esteller M., 2017 Epigenetic Mechanisms in Cancer Development. In: *The Molecular Basis of Human Cancer*, Springer Science, New York, pp. 263–275.
- Masuzawa T., Miyaura C., Onoe Y., Kusano K., Ohta H., Nozawa S., *et al.*, 1994 Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J. Clin. Invest.* **94**: 1090–1097.
- Mattick J. S., Taft R. J., Faulkner G. J., 2010 A global view of genomic information - moving beyond the gene and the master regulator. *Trends Genet.* **26**: 21–28.
- Mellay V. Le, Grosse B., Lieberherr M., 1997 Phospholipase C  $\beta$  and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.* **272**: 11902–11907.
- Mellibovsky-Saidler L., Díez-Pérez A., 2006 Qué significa la calidad ósea. *Semin. la Fund. Española Reumatol.* **7**: 165–176.
- Mi H., Poudel S., Muruganujan A., Casagrande J. T., Thomas P. D., 2016 PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **44**: 336–342.
- Minisola S., Pacitti M. T., Ombriccolo E., Costa G., Scarda A., Palombo E., *et al.*, 1998 Bone turnover and its relationship with bone mineral density in pre- and postmenopausal women with or without fractures. *Maturitas* **29**: 265–270.
- Mirzayans F., Lavy R., Penner-Chea J., Berry F. B., 2012 Initiation of Early Osteoblast Differentiation Events through the Direct Transcriptional Regulation of *Msx2* by. *PLoS One* **7**: 1–8.
- Mitchell B. D., Yerges-Armstrong L. M., 2011 The genetics of bone loss: Challenges and prospects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**: 1258–1268.
- Miyaura C., Onoe Y., Inada M., Maki K., Ikuta K., Ito M., *et al.*, 1997 Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: Similarity to estrogen deficiency. *Med. Sci.* **94**: 9360–9365.
- Mizuno Y., Yagi K., Tokuzawaa Y., Kanesaki-Yatsuka Y., Suda T., Katagiri T., *et al.*, 2008 miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**: 267–272.

- Mizunoa Y., Tokuzawaa Y., Ninomiyaa Y., Yagi K., Yatsuka-Kanesaki Y., Suda T., *et al.*, 2009 miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett.* **583**: 2263–2268.
- Moorthi R. N., Moe S. M., 2013 Recent advances in the noninvasive diagnosis of renal osteodystrophy. *Kidney Int* **84**: 886–894.
- Moro L., Romanello M., Favia A., Lamanna M. P., Lozupone E., 2000 Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions. *Calcif. Tissue Int.* **66**: 151–156.
- Morony S., Capparelli C., Lee R., Shimamoto G., Boone T., Lacey D. L., *et al.*, 1999 A Chimeric Form of Osteoprotegerin Inhibits Bone Resorption Induced by IL-1beta, TNF-alpha, PTH, PTHrP and 1,25(OH)2D3. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1478–1485.
- Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., Kurata K., Oh-hora M., Feng J. Q., *et al.*, 2011 Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* **17**: 1231–1234.
- Naylor K., Eastell R., 2012 Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**: 379–389.
- Nguyen V. T., Benveniste E. N., 2000 Involvement of STAT-1 and Ets family members interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**: 23674–23684.
- Nishimura R., Hata K., Matsubara T., Wakabayashi M., Yoneda T., 2012 Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J. Biochem.* **151**: 247–254.
- Nissen-Meyer L. S. H., Jemtland R., Gautvik V. T., Pedersen M. E., Paro R., Fortunati D., *et al.*, 2007 Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J. Cell Sci.* **120**: 2785–2795.
- Omatsu Y., Seike M., Sugiyama T., Kume T., Nagasawa T., 2014 Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature* **508**: 536–540.
- Onal M., Xiong J., Chen X., Thostenson J. D., Almeida M., Manolagas S. C., *et al.*, 2012 Receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *J. Biol. Chem.* **287**: 29851–29860.
- Pacifi R., 1998 Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis - The second decade. *Endocrinology* **139**: 2659–2661.
- Pacifici R., Rifas L., Teitelbaum S., Slatopolsky E., McCracken R., Bergfeld M., *et al.*, 1987 Spontaneous release of interleukin 1 from human blood monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4616–4620.
- Pacifici R., 1996 Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 1043–1051.

- Pacifici R., 2010 The immune system and bone. *Arch. Biochem. Biophys.* **503**: 41–53.
- Pacifici R., 2012a Role of T cells in ovariectomy induced bone loss- revisited. *Journal Bone Miner. Res.* **27**: 231–239.
- Pacifici R., 2012b Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *J. Bone Miner. Res.* **27**: 231–239.
- Pacifici R., 2013 Osteoimmunology and its implications for transplantation. *Am. J. Transplant.* **13**: 2245–2254.
- Pacifici R., 2017 T cells, osteoblasts, and osteocytes: interacting lineages key for the bone anabolic and catabolic activities of parathyroid hormone. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 **1364**: 11–24.
- Panach L., Mifsut D., Tarín J.J., Cano A., García-Pérez M.Á., 2014 Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women. *J. Bone Miner. Metab.* **32**: 691–698.
- Panach L., Pineda B., Mifsut D., Tarín J. J., Cano A., García-Pérez M. Á., 2016 The role of CD40 and CD40L in bone mineral density and in osteoporosis risk : A genetic and functional study. *Bone* **83**: 94–103.
- Panach L., Serna E., Tarín J. J., Cano A., García-Pérez M. Á., 2017 A translational approach from an animal model identifies CD80 as a candidate gene for the study of bone phenotypes in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.*
- Papachristou N. I., Blair H. C., Kypreos K. E., Papachristou D. J., 2017 High-density lipoprotein (HDL) metabolism and bone mass. *J. Endocrinol.* **233**: R95–R107.
- Pastinen T., 2004 Cis-Acting Regulatory Variation in the Human Genome. *Science (80-. ).* **306**: 647–650.
- Patiño-García A., Zalacain M., Folio C., Zandueta C., Sierrasesúmaga L., Julián M. S., *et al.*, 2009 Profiling of Chemonaive Osteosarcoma and Paired-Normal Cells Identifies EBF2 as a Mediator of Osteoprotegerin Inhibition to Tumor Necrosis Factor – Related Apoptosis-Inducing Ligand – Induced Apoptosis. *Hum. Cancer Biol.* **15**: 5082–5092.
- Peacock M., Turner C. H., Econs M. J., Foroud T., 2010 Genetics of Osteoporosis. *Endocr. Rev.* **31**: 629–662.
- Pearson T. a, Manolio T. A., 2008 How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* **299**: 1335–44.
- Perini G., Diolaiti D., Porro A., Valle G. Della, 2005 In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 12117–22.
- Pfaffl M. W., 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.



- Pineda B., Laporta P., Hermenegildo C., Cano A., García-Pérez M.Á, 2008 A C >T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* **19**: 1147–1152.
- Pineda B., Hermenegildo C., Laporta P., Tarín J.J., Cano A., García-Pérez M.Á, 2010 Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J. Bone Miner. Metab.* **28**: 696–705.
- Pineda B., Tarín J.J., Hermenegildo C., Laporta P., Cano A., García-Pérez M.Á, 2011 Gene-gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women. *Osteoporos. Int.* **22**: 1451–1458.
- Pineda B., Serna E., Laguna-Fernández A., Noguera I., Panach L., Hermenegildo C., *et al.*, 2014 Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: A functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women. *Bone* **65**: 33–41.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Punga T., Panse R. Le, Andersson M., Truffault F., Berrih-Aknin S., Punga A. R., 2014 Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **1**: 49–58.
- Qian H., Badaloni A., Chiara F., Stjernberg J., Polisetti N., Nihlberg K., *et al.*, 2013 Molecular Characterization of Prospectively Isolated Multipotent Mesenchymal Progenitors Provides New Insight into the Cellular Identity of Mesenchymal Stem Cells in Mouse Bone Marrow. *Mol. Cell. Biol.* **33**: 661–677.
- Raggatt L. J., Qin L., Tamasi J., Jefcoat S. C., Shimizu E., Selvamurugan N., *et al.*, 2008 Interleukin-18 Is Regulated by Parathyroid Hormone and Is Required for Its Bone Anabolic Actions. *J. Biol. Chem.* **283**: 6790–6798.
- Raggatt L. J., Partridge N. C., 2010 Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling \*. **285**: 25103–25108.
- Rajender S., Avery K., Agarwal A., 2011 Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **727**: 62–71.
- Ralston S. H., 2002 Genetic Control of Susceptibility to osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 2460–2466.
- Ralston S. H., 2003 Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**: 286–290.
- Ralston S. H., Crombrugge B. De, Crombrugge B. de, 2006 Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev.* **20**: 2492–2506.
- Ralston S. H., Uitterlinden A. G., 2010 Genetics of Osteoporosis. *Endocr. Rev.* **31**: 629–662.

- Reyes-Botella C., Montes M., Vallecillo-Capilla M., 2000 Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation by cultured human osteoblasts. *J Periodontol* **71**: 614–617.
- Reyes García R., Rozas Moreno P., Muñoz-Torres M., 2008 Regulación del proceso de remodelado óseo. *Rev. Esp. Enfermedades Metab. Oseas* **17**: 10–14.
- Richards J., Rivadeneira F., Inouye M., Pastinen T., Soranzo N., Wilson S., *et al.*, 2008 Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* **371**: 1505–1512.
- Richards J. B., Kavvoura F. K., Rivadeneira F., Styrkársdóttir U., Estrada K., Halldórsson B. V., *et al.*, 2009 Collaborative meta-analysis: Associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann. Intern. Med.* **151**: 528–537.
- Riggs B. L., Khosla S., Melton L. J., 1998 A unitary model for involuntional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J. bone Miner.* **13**: 763–73.
- Rivadeneira F., Styrkársdóttir U., Estrada K., Halldórsson B. V., Hsu Y.-H., Richards J. B., *et al.*, 2009 Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **41**: 1199–1206.
- Rivadeneira F., Mäkitie O., 2016 Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**: 262–281.
- Robinson M. R., Wray N. R., Visscher P. M., 2014 Explaining additional genetic variation in complex traits. *Trends Genet.* **30**: 124–132.
- Rocheffort G. Y., Pallu S., Benhamou C. L., 2010 Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int.* **21**: 1457–1469.
- Rubin M. R., Cosman F., Lindsay R., Bilezikian J. P., 2002 The anabolic effects of parathyroid hormone therapy. *Osteoporos. Int.* **13**: 267–277.
- Sakamoto W., Isomura H., Fujie K., Iizuka T., Nishihira J., Tatebe G., Takahashi K., Osaki Y., Komai M., Tamai H., 2005 The effect of vitamin K-2 on bone metabolism in aged female rats. *Osteoporos. Int.* **16**: 1604–1610.
- Schroeder T. M., Westendorf J. J., 2005 Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J. Bone Miner. Res.* **20**: 2254–2263.
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T., 2006 The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**: 3.
- Seda V., Mraz M., 2014 B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur. J. Haematol.* **94**: 193–205.

- Seeliger C., Karpinski K., Haug A. T., Vester H., Schmitt A., Bauer J. S., Griensven M. van, 2014 Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J. Bone Miner. Res.* **29**: 1718–1728.
- Seibel M. J., 2005 Biochemical markers of bone turnover: Part I: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* **26**: 97–122.
- Seo E., Basu-Roy U., Zavadil J., Basilico C., Mansukhani A., 2011 Distinct Functions of Sox2 Control Self-Renewal and Differentiation in the Osteoblast Lineage. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 4593–4608.
- Shinohara M., Koga T., Okamoto K., Sakaguchi S., Arai K., Yasuda H., *et al.*, 2008 Tyrosine Kinases Btk and Tec Regulate Osteoclast Differentiation by Linking RANK and ITAM Signals. *Cell* **132**: 794–806.
- Simonet W. ., Lacey D. ., Dunstan C. ., Kelley M., Chang M.-S., Lüthy R., *et al.*, 1997 Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* **89**: 309–319.
- Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V., 2006 SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**: 1928–1929.
- Straussman R., Nejman D., Roberts D., Steinfeld I., Blum B., Benvenisty N., *et al.*, 2009 Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 564–571.
- Styrkarsdottir U., Halldorsson B. V., Gretarsdottir S., Gudbjartsson D. F., Walters G. B., Ingvarsson T., *et al.*, 2009 New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat. Genet.* **41**: 15–17.
- Sugatani T., Vacher J., Hruska K. A., 2011 A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood* **117**: 3648–3657.
- Sugatani T., Hruska K. A., 2013 Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *J. Cell. Biochem.* **114**: 1217–1222.
- Tabas-Madrid D., Nogales-Cadenas R., Pascual-Montano A., 2012 GeneCodi3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**: 478–483.
- Takahashi M., Kushida K., 1997 Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **47**: 177–183.
- Takai D., Jones P., 2002 Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3740–5.
- Tate P. H., Bird A. P., 1993 Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 226–231.
- Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S. K., Fortun Y., Redini F., Heymann D., 2004 The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**: 457–475.

- Thurman R. E., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M. T., Haugen E., *et al.*, 2012 The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* **489**: 75–82.
- Tone M., Tone Y., Babik J. M., Lin C. Y., Waldmann H., 2002 The role of Sp1 and NF- $\kappa$ B in regulating CD40 gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**: 8890–8897.
- Toraldo G., Roggia C., Qian W.-P., Pacifici R., Weitzmann M. N., 2003 IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 125–30.
- Uitterlinden A. G., van Meurs J. B. J., Rivadeneira F., Pols H. A. P., 2006 Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **6**: 16–26.
- Urano T., Inoue S., 2014a Genetics of osteoporosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**: 287–293.
- Urano T., Inoue S., 2014b Biochemical and Biophysical Research Communications Genetics of osteoporosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**: 287–293.
- Väänänen H. K., Zhao H., Mulari M., Halleen J. M., 2000 The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* **113**: 377–381.
- Velasco J., Riancho J., 2008 La vía wnt y el hueso. *Rev. Española Enfermedades Metabólicas Óseas* **17**: 5–9.
- Velázquez-Cruz R., Jiménez-Ortega R. F., Parra-Torres A. Y., Castillejos-López M., Patiño N., Qúiterio M., *et al.*, 2014 Analysis of association of MEF2C, SOST and JAG1 genes with bone mineral density in Mexican-Mestizo postmenopausal women. *BMC Musculoskelet. Disord.* **15**: 1–8.
- Vidal C., Formosa R., Xuereb-Anastasi A., 2011 Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *J. Mol. Endocrinol.* **47**: 327–333.
- Wagner M., Sobczyk M., Bilińska M., Pokryszko-Dragan A., Cyruł M., Kuśnierczyk P., Jasek M., 2015 MS risk allele rs1883832T is associated with decreased mRNA expression of CD40. *J. Mol. Neurosci.* **56**: 540–545.
- Walsh M. C., Kim N., Kadono Y., Rho J., Lee S. Y., Lorenzo J., *et al.*, 2006 Osteoimmunology: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism. *Annu. Rev. Immunol.* **24**: 33–63.
- Weaver C. M., Peacock M., Martin B. R., McCabe G. P., Zhao J., Smith D. L., *et al.*, 1997 Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1714–20.
- Wein M. N., Spatz J., Nishimori S., Doench J., Root D., Nagano K., Baron R., *et al.*, 2015 HDAC5 controls MEF2C-driven sclerostin expression in osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* **30**: 400–411.

- Weitzmann M., Roggia C., Toraldo G., Weitzmann L., Pacifici R., 2002 Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J. Clin. Invest.* **110**: 1643–1650.
- Weitzmann M. N., Pacifici R., 2006 Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *J. Clin. Invest.* **116**: 1186–1194.
- Weitzmann M. N., 2013 The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*. **2013**: 1–29.
- Westendorf J. J., Kahler R. A., Schroeder T. M., 2004 Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* **341**: 19–39.
- Wheater G., Hogan V. E., Teng Y. K. O., Tekstra J., Lafeber F. P., Huizinga T. W. J., *et al.*, 2011 Suppression of bone turnover by B-cell depletion in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoporos. Int.* **22**: 3067–3072.
- Wu H., Whitfield T. W., Gordon J. A. R., Dobson J. R., Tai P. W. L., Van Wijnen A. J., *et al.*, 2014 Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol.* **15**: 1–17.
- Xiao Y., Fu H., Prasadam I., Yang Y. C., Hollinger J. O., 2007 Gene expression profiling of bone marrow stromal cells from juvenile, adult, aged and osteoporotic rats: With an emphasis on osteoporosis. *Bone* **40**: 700–715.
- Yamada Y., Ando F., Niino N., Shimokata H., 2004 Association of a Polymorphism of the Matrix Metalloproteinase–9 Gene With Bone Mineral Density in Japanese Men. *Metabolism* **53**: 135–137.
- Yavropoulou M. P., Yovos J. G., 2007 The role of the wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones* **6**: 279–294.
- Young M. F., 2003 Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos. Int.* **14 Suppl 3**: S35–42.
- Yun T. J., Chaudhary P. M., Shu G. L., Frazer J. K., Ewings M. K., Schwartz S. M., *et al.*, 1998 OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol.* **161**: 6113–6121.
- Zelzer E., Olsen B. R., 2003 The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* **423**: 343–348.
- Zhang Z., Shively J. E., 2013 Acceleration of Bone Repair in NOD/SCID Mice by Human Monoosteophils, Novel LL-37-Activated Monocytes. *PLoS One* **8**: 1–11.
- Zheng H., Duncan E., Yerges-Armstrong L. M., Eriksson J., Leo P. J., Leslie W. D., *et al.*, 2013 Meta-Analysis of Genome-Wide Studies Identifies MEF2C SNPs Associated with Bone Mineral Density at Forearm. *J. Med. Genet.* **50**: 473–478.



## 8. PUBLICACIONES





## Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women

Layla Panach · Damián Mifsut · Juan J. Tarín · Antonio Cano · Miguel Ángel García-Pérez

Received: 21 May 2013 / Accepted: 4 November 2013  
© The Japanese Society for Bone and Mineral Research and Springer Japan 2013

**Abstract** Gene candidate and genome-wide association studies have revealed tens of loci of susceptibility for osteoporosis. Some limitations such as sample size, use of confounding variables, and control for multiple testing and for population stratification, however, represent common problems in these studies that make replication in independent cohorts desirable and even necessary. The main objective of the present study is to replicate previous data on three functional polymorphisms in a cohort of Spanish women. To that end, we performed an association study of three functional polymorphisms previously associated with bone phenotypes in the *LRP5*, *TNFRSF11B*, and *FGFBP1* genes with low bone mineral density (BMD) in a cohort of 721 Spanish women, most of them postmenopausal. We detected a strong significant association, even when correcting for multiple comparisons, for polymorphism rs312009 in the *LRP5* gene with low BMD at the lumbar-

spine site. These were women with the CC genotype, which showed the worst bone parameters. Moreover, these women had a higher risk of osteoporosis (adjusted odds ratio 2.82,  $P = 0.001$ ) than women with the TT/TC genotype. This association seems to be caused because the rs312009 single nucleotide polymorphism (SNP) is located at a binding site for the transcription factor RUNX2 at the 5' region of the *LRP5* gene, and the T allele seems to be a better transcriber than the C allele. Regarding the other two SNPs, only the rs4876869 SNP in the *TNFRSF11B* gene showed a suggestive trend for both skeletal sites. These results underscore the significance of the *LRP5* gene in bone metabolism and emphasize the significance of the replication of previous results in independent cohorts.

**Keywords** Association study · Replication study · Functional polymorphisms · Bone mineral density

L. Panach · M. Á. García-Pérez  
Research Foundation, Institute of Health Research  
INCLIVA, Valencia, Spain

D. Mifsut  
Orthopedic Surgery and Traumatology, Clinic Hospital,  
Institute of Health Research INCLIVA, Valencia, Spain

J. J. Tarín  
Department of Functional Biology and Physical  
Anthropology, University of Valencia, Valencia, Spain

A. Cano  
Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,  
University of Valencia, Valencia, Spain

M. Á. García-Pérez (✉)  
Department of Genetics, University of Valencia,  
C/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain  
e-mail: migarpe@uv.es

### Introduction

Osteoporosis is a common age-related skeletal pathology, and is associated with low bone mineral density (BMD) and with a deterioration of bone microarchitecture, leading to increased fragile bone fractures. Consequently, it is linked to increased morbidity and mortality, mainly in developed countries [1]. Several twin, family, and epidemiological studies have revealed an important contribution of genetic factors to the phenotypic variation of different bone phenotypes such as BMD, skeletal geometry or ultrasonic properties of bone. Nevertheless, given that osteoporosis is a multifactorial disease, environmental factors are important in the predisposition to this disease [2].

In the search for genes involved in the pathophysiology of osteoporosis, researchers have moved from performing

association studies with prior hypotheses on candidate genes to conducting studies along the whole genome; this has been enabled by the new technology of large-scale genotyping. Using the first approach, bone phenotype-associated polymorphisms in genes associated with bone metabolism or cytokine, such as *ESR1*, *COL1A1*, *VDR*, *TGFBI*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *OPG*, or *LRP5*, have been reported [3–5]. Using the genome-wide approach, dozens of loci associated with BMD in biological pathways such as the Wnt/ $\beta$ -catenin, the estrogen endocrine, the RANKL/RANK/OPG, the bone ossification, the mesenchymal stem cell differentiation, and the osteoblast/osteoclast differentiation signalling pathways have been reported. Nevertheless, around 30 BMD loci without prior molecular or biological evidence of their involvement in bone have been reported [6].

In any case, in association studies, particularly in the genome-wide approach, the causative variant remains essentially unidentified. Consequently, association studies of polymorphisms with previous biological or molecular evidence of association with bone phenotypes are of undoubted interest, and replication studies in other populations reinforce their significance [7]. In the present work, we performed a replication study of three previously described functional polymorphisms in a cohort of Spanish women: rs312009, a C>T single nucleotide polymorphism (SNP) located at the 5' region in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) gene; rs4876869, a T>C SNP located at intron 2 in the *TNFRSF11B* (osteoprotegerin) gene; and rs12503796, a C>A SNP located at the promoter of the fibroblast growth factor binding protein 1 (*FGFBP1*) gene.

The *LRP5* gene encodes for the low-density lipoprotein receptor-related peptide 5 (LRP5) which is a transmembrane protein implicated in the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway. This pathway plays a pivotal role in embryonic development, oncogenesis, adipogenesis, and bone metabolism [8]. Indeed, LRP5 has a key role in skeletal homeostasis by inducing both the differentiation and proliferation of osteoblasts and inhibiting osteoblast and osteocyte apoptosis by increasing the levels of  $\beta$ -catenin. Gain-of-function mutations in the *LRP5* gene cause an autosomal dominant type of osteopetrosis [9], whereas loss-of-function mutations cause the autosomal recessive osteoporosis pseudoglioma syndrome characterized by low bone mass and blindness [10], indicating the essential role of LRP5 in bone homeostasis. The locus harbouring the *LRP5* gene has been associated with low BMD and risk of fractures in several genome-wide association studies (GWAS; [11–14]). The rs312009 SNP, located at the 5' region in the *LRP5* gene, has been previously described as a functional polymorphism altering in vitro gene expression since it is located at a binding site for the transcription factor RUNX2 [15].

The *FGFBP1* gene encodes for fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1), a protein that binds various fibroblast growth factors (FGFs), such as FGF-1 and FGF-2. The ability of FGFBP1 to bind and alter the properties of FGF-2 makes the study of this protein in relation to BMD relevant. Indeed, FGF-2 is a protein essential for the regulation of the differentiation, proliferation, and apoptosis of human osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways that result in an increase in the expression of the transcription factors involved in osteoblast differentiation and function, such as type I collagen and alkaline phosphatase [16]. The rs12503796 SNP, located at the promoter region in the *FGFBP1* gene, has been previously described as a functional polymorphism that modulates the expression of the FGFBP1 protein [17].

The *TNFRSF11B* gene encodes for the tumour necrosis factor receptor superfamily, member 11b (TNFRSF11B) or osteoprotegerin (OPG). TNFRSF11B is secreted by osteoblast/stromal/B-cells in the bone microenvironment and is the main physiological inhibitor of osteoclastogenesis through its binding to RANKL, thus preventing the activation of osteoclast precursors through RANK. Its over-expression causes osteopetrosis in mice, while loss of function mutations causes severe osteoporosis [18]. The locus harbouring *TNFRSF11B* has also been associated with low BMD and risk of fractures in several GWAS [13, 14, 19]. The A>G rs4876869 SNP is located at intron 2 in the *TNFRSF11B* gene, and it has been reported to affect gene expression by influencing in vitro pre-mRNA splicing [20].

The purpose of the present study was to test whether functional polymorphisms in the *LRP5*, *TNFRSF11B*, and *FGFBP1* genes, which have been previously associated with bone phenotypes such as low BMD and/or osteoporotic fracture, also influence the BMD of femoral neck or lumbar spine. The study was carried out in a cohort of Spanish women, most of whom were postmenopausal, and was different from the original cohort, since a positive replication would significantly strengthen the role of these genetic variants in bone homeostasis.

## Materials and methods

### Study subjects

The study group comprised women of Spanish ancestry from a population-based cohort we regularly analyze in epidemiological studies [21, 22]. All the women lived Valencia, a city located on the Mediterranean Sea in the east of Spain, and were recruited consecutively and without other selection criteria from the population regularly

receiving health care services at the Menopause Unit of our hospital. Women were classified as postmenopausal if they had amenorrhea of at least 6 months of duration or if they had been subjected to a surgical bilateral ovariectomy performed before menopause, and were classified as premenopausal if their menstruation was irregular and/or up to 6 months had elapsed since their last period or if they were menstruating regularly. Women with a history of bone disease other than primary osteoporosis, who had used any medication known to alter bone mass or bone metabolism, except for hormone replacement therapy (HRT), were younger than 35 years or had not signed the informed consent were excluded from the study.

In the present study, we genotyped 797 women in our cohort, and the data on allelic frequencies, genotype and Hardy–Weinberg equilibrium are shown in Table 1. Of them, 721 had a densitometric study and met the selection criteria. Of these, 619 were postmenopausal women and 102 pre- or perimenopausal (66 % perimenopausal). Since they were women who belonged to the Hospital area, we had access to their medical records. Nevertheless, all of them completed a questionnaire on osteoporosis risk factors such as age, menopausal status, height and weight, and use of HRT or medication known to affect bone metabolism, and data were recorded. Age, years since menopause (YSM), height, weight, HRT use, and menopausal status were used as covariates in the analysis of the data. The local ethics committee approved the study and protocol, and written informed consent was obtained from all women in accordance with the regulations of the Institute of Health Research INCLIVA and Ethics Committee of our centre.

Anthropometric and bone density measurements

The body mass index (BMI) was calculated for each subject as the ratio between weight (kg) and height squared (m<sup>2</sup>).

Measurements of bone mineral density (BMD) were performed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) at

the lumbar spine from L2 to L4 (LS-BMD) and at the non-dominant proximal femoral neck (FN-BMD) with Norland XR-36 (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, USA) or Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA) densitometers. Software calculated the BMD and presented it as g/cm<sup>2</sup>. The Z- and T-scores were the number of SDs by which a given measurement differed from the mean for a sex- and age-matched population and for a normal young adult reference population, respectively. In the present work, in order to compare DXA data performed with two different densitometers, we calculated a standardized BMD (sBMD) [22].

Single nucleotide polymorphisms and genotyping

DNA was obtained from blood samples that were collected in tubes containing disodium-EDTA as an anticoagulant and stored at 4 °C until extraction. Genomic DNA was isolated from nucleated cells after red-blood lysis with ammonium chloride using a genomic DNA extraction kit (REAL, Durviz, Valencia, Spain), according to the manufacturer's instructions [22]. The DNA obtained gave a 260/280-absorbance ratio of 1.6–2.0, indicating high-quality DNA.

The genotyping of three SNPs was performed by TaqMan allelic discrimination real-time PCR on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the protocol provided by the manufacturer. The commercial probes (Applied Biosystems) were, C\_976102\_10 for rs312009 SNP in *LRP5* gene, C\_1841371\_10 for rs4876869 SNP in *TNFRSF11B* gene, and C\_2972474\_10 for rs12503796 in *FGFBP1* gene. Briefly, 20 ng of genomic DNA was amplified on 96-well plates in the presence of 1× TaqMan probe assay and 1× TaqMan Genotyping PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reproducibility was estimated by re-genotyping about 8 % of the samples in each plate and was always higher than 99 %. Between 0.5 and 3.0 % of the genotypes (depending on the SNP) were unclear, mainly

**Table 1** Genotype and allele frequencies and Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) *P* values for the polymorphisms analyzed

Gene	SNP	Genotype	<i>N</i> (frequency)	Allele (frequency)	HWE <i>P</i> value
<i>LRP5</i>	rs312009	CC	588 (0.74)	C (0.85)	0.089
		CT	186 (0.23)	T (0.15)	
		TT	23 (0.03)		
<i>TNFRSF11B</i>	rs4876869	AA	279 (0.35)	A (0.60)	0.160
		AG	399 (0.50)	G (0.40)	
		GG	119 (0.15)		
<i>FGFBP1</i>	rs12503796	CC	239 (0.30)	C (0.54)	0.420
		CA	383 (0.48)	A (0.46)	
		AA	175 (0.22)		

due to poor amplifications, and samples had to be re-genotyped. The FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/>) [23], a web-based tool to identify potentially functional SNPs, assigned a very low–low risk to the rs4876869 SNP in *TNFRSF11B* gene because it is on a putative intronic enhancer site, and unknown risks to the other two SNPs.

#### Statistical analysis

To test the population homogeneity of the study participants and to assess the genotyping quality, genotypic frequencies for each polymorphism were tested against Hardy–Weinberg proportions by standard  $\chi^2$  tests using SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>) [24]. The model of inheritance (co-dominant, dominant, overdominant, and recessive) was also analyzed with SNPStats software.

Fixed-effects designs of analysis of variance were used for comparisons of means. Differences in sBMD between genotypes of SNP rs312009 in the *LRP5* gene and SNP rs4876869 in the *TNFRSF11B* gene were evaluated using regression analysis after adjusting (or not) for covariates age, years since menopause, height, weight, HRT use, and menopausal status. Regression analyses were corrected for multiple testing with the Bonferroni correction method. Odds ratios (with 95 % confidence intervals) were calculated by logistic regression analysis to estimate the relative risk of lumbar spine and/or femoral neck osteoporosis according to the WHO definition ( $T$ -score  $\leq -2.5$ ).

The sample size in this study has approximately 80 % power to detect a gene effect of  $R^2 = 0.010$  on BMD according to a MAF of 0.15 (T allele, rs312009; Table 1) under a dominant model of inheritance and a mean  $\pm$  SD for LS-BMD of  $0.999 \pm 0.145$  g/cm<sup>2</sup> (Table 2) using the QUANTO software package (<http://hydra.usc.edu/GxE/>) [25].

Values shown in the text, tables and figures are mean  $\pm$  SD or frequencies, unless specified. All analyses were two-tailed, and significance was defined as  $P < 0.05$ , except when multiple comparisons were analyzed. Data in Table 3 were considered statistically different if the  $P$  value was  $< 0.0083$  after the applying the Bonferroni correction (0.05/6; two phenotypes, three comparisons). The entire statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) v.19.0 for Windows.

## Results

Table 1 shows the genotype and allele frequencies and the  $P$  value for the Hardy–Weinberg equilibrium of the polymorphisms studied in this work. Note that the frequency

**Table 2** Characteristics of the 721 Spanish women included in the present study with their densitometric analysis

	N	Value
Age (years) <sup>a</sup>	721	51.9 $\pm$ 6.3
Years since menopause <sup>a</sup>	721	5.3 $\pm$ 5.8
Height (cm)	715	157.7 $\pm$ 6.2
Weight (kg)	715	65.7 $\pm$ 10.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	715	26.5 $\pm$ 4.2
FN-sBMD (g/cm <sup>2</sup> )	680	0.802 $\pm$ 0.109
FN $T$ -score	680	-0.903 $\pm$ 0.956
FN $Z$ -score	680	-0.105 $\pm$ 0.932
LS-sBMD (g/cm <sup>2</sup> )	719	0.998 $\pm$ 0.145
LS $T$ -score	719	-1.094 $\pm$ 1.378
LS $Z$ -score	719	-0.244 $\pm$ 1.167

Values are mean  $\pm$  SD. Data refer to the date of the lumbar column densitometry

BMI body mass index, LS lumbar spine, FN femoral neck, sBMD standardized bone mineral density

<sup>a</sup> The data for women with FN-sBMD were age  $52.5 \pm 5.6$  years, and years since menopause  $5.6 \pm 5.7$

**Table 3** Analysis of the association between genotypes and bone phenotypes uncorrected for covariates

Gene SNP (rs)	Genotype	FN-sBMD	LS-sBMD
<i>LRP5</i> rs312009	CC	0.801 $\pm$ 0.110	0.990 $\pm$ 0.143
	CT	0.805 $\pm$ 0.105	1.023 $\pm$ 0.143
	TT	0.809 $\pm$ 0.111	1.040 $\pm$ 0.155
	$P$ value (best model)	0.721 (dominant)	0.005 (dominant)
<i>TNFRSF11B</i> rs4876869	AA	0.793 $\pm$ 0.111	0.993 $\pm$ 0.150
	AG	0.809 $\pm$ 0.109	1.000 $\pm$ 0.140
	GG	0.803 $\pm$ 0.109	1.001 $\pm$ 0.152
	$P$ value (best model)	0.090 (dominant)	0.504 (dominant)
<i>FGFBP1</i> rs12503796	AA	0.795 $\pm$ 0.110	1.006 $\pm$ 0.141
	AC	0.806 $\pm$ 0.110	1.000 $\pm$ 0.146
	CC	0.801 $\pm$ 0.108	0.993 $\pm$ 0.144
	$P$ value (best model)	0.416 (recessive)	0.427 (dominant)

Values are mean  $\pm$  SD. The inheritance pattern was obtained with SNPStats software

distribution is consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium for all. This is in agreement with previous data obtained with STRUCTURE software, for which our cohort consisted of a single population (probability = 0.996), and models that assumed 2–5 populations had a negligible probability [21].



Table 2 shows the main characteristics of the participating women in the present study. Note that the population shows normal bone parameters or mild osteopenia (for lumbar spine) that are compatible with the mean age of  $51.9 \pm 6.3$  years for our cohort.

The association of polymorphisms in the *LRP5*, *TNFRSF11B*, and *FGFBP1* genes with sBMD of femoral neck and lumbar spine, all without adjusting for covariates, are shown in Table 3. Note that the SNP rs312009 in the *LRP5* gene is associated with LS-sBMD even correcting for multiple comparisons ( $P < 0.0083$ ; 0.05/6 according to Bonferroni). The software SNPStats assigned this SNP a dominant inheritance model for the T allele, these being women of genotypes TT/TC which showed improved bone parameters at the lumbar spine site. The SNP rs4876869 in the *TNFRSF11B* gene showed a clear trend for association with femoral neck sBMD (Table 3), although this association was not statistically significant ( $P < 0.0083$ , Bonferroni). Finally, the SNP rs12503796 in the *FGFBP1* gene showed no association with any bone phenotype so we did not continue to study it.

The association of polymorphism rs312009 in the *LRP5* gene grouped according to the dominant mode of inheritance (TT/TC vs. CC), adjusted for the covariates age, YSM, height, weight, postmenopausal status and HRT use, is shown in Table 4. The data reveals an association of this polymorphism with the bone phenotypes studied even when adjusted for covariates as described above. Regarding polymorphism rs4876869 in the *TNFRSF11B* gene, women of genotype GG/GA tended to have improved bone parameters in the femoral neck, although the difference was not statistically significant.

Finally, Table 5 shows the estimated risk of osteoporosis at the lumbar spine and/or femoral neck sites using

logistic regression, adjusted (or not) for covariates, according to a dominant model of inheritance for rs312009 and rs4876869 SNPs. Regarding the SNP rs312009, women with the CC genotype show an increased risk of osteoporosis at the lumbar spine of 2.42 times ( $P$  value 0.002) for unadjusted data and 2.82 times ( $P$  value 0.001) for adjusted data for covariates regarding women with the TT/TC genotype. Meanwhile, women of the AA genotype for the SNP rs4876869 showed a trend toward increased risk of osteoporosis at both skeletal sites, although this trend was not significant.

### Discussion

The search for and identification of susceptibility genes for osteoporosis have been accomplished using several experimental approaches. One of these, the hypothesis-driven candidate gene association study, has revealed many polymorphisms associated with bone phenotypes, principally BMD and bone fracture, in genes involved in bone metabolism and the endocrine route of estrogen, and in genes of the calciotropic hormones and cytokines and their receptors, especially RANKL, RANK and OPG genes, among others [2, 26, 27]. That notwithstanding, many of these associations have not been replicated in independent cohorts [2, 7, 26, 28].

More recently, thanks to advances in high-throughput genotyping methods, and the introduction of GWAS, there has been a revolution which has increased the number of genes and pathways possibly involved in the pathophysiology of osteoporosis [6, 11]. However, neither type of study is without limitations. For example, a lack of well-defined case and control groups, sufficient sample size, adjustment for confounder variables, and control for multiple testing and population stratification are common problems of all of them [29, 30].

Some ways to contrast the involvement of the actual association of the polymorphisms described in different association studies with the pathophysiology of osteoporosis are to analyze the possible functionality of these polymorphisms using in vitro approaches and/or replication studies in cohorts independent of the discovery cohort. In the present study, we tried to replicate the association in our own cohort of women of three polymorphisms associated with bone phenotypes that were previously presented as functional polymorphisms affecting gene expression in in vitro studies [15, 17, 20].

The allelic and genotypic frequencies listed in Table 1 for the rs312009 polymorphism in the *LRP5* gene are virtually identical to those described previously in another Spanish Mediterranean cohort [31], while the frequencies of the rs4876869 and rs12503796 polymorphisms in the

**Table 4** Multivariate analysis between polymorphisms rs312009 (*LRP5*) and rs4876869 (*TNFRSF11B*) and bone phenotypes, adjusting for the covariates age, YSM, height, weight, menopausal status, and HRT use, according to genotype and a dominant model of inheritance

	Adjusted phenotypes
rs312009	LS-sBMD
TT/TC	1.024 ± 0.010
CC	0.991 ± 0.006
<i>P</i> value	0.004
rs4876869	FN-sBMD
GG/GA	0.806 ± 0.005
AA	0.795 ± 0.007
<i>P</i> value	0.178

Values are the adjusted mean ± SE. The *P* value in the table is that from the multivariate analysis after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons

**Table 5** Estimation of risk for femoral neck and lumbar spine osteoporosis, adjusted by age, YSM, height, weight, menopausal status, and HRT use, according to genotype and a dominant model of inheritance

SNP (gene)	Phenotype	Genotypes (N)	Cases (%) <sup>a</sup>	Unadjusted OR (95 % CI)	P value	Adjusted OR (95 % CI)	P value
rs312009 ( <i>LRP5</i> )	LS osteoporosis	TT/TC (186)	8.7	1		1	
		CC (533)	18.7	2.42 (1.38–4.22)	0.002	2.82 (1.53–5.22)	0.001
rs4876869 ( <i>TNFRSF11B</i> )	FN osteoporosis	GG/GA (431)	3.5	1		1	
		AA (249)	6.0	1.78 (0.85–3.71)	0.123	1.67 (0.77–3.62)	0.192
	LS osteoporosis	GG/GA (431)	15.0	1		1	
		AA (249)	19.9	1.41 (0.94–2.11)	0.093	1.36 (0.88–2.10)	0.170

OR odds ratio, CI confidence interval

<sup>a</sup> The percentage of women with the given genotype who display femoral-neck or lumbar-spine osteoporosis (*T*-score  $\leq -2.5$ )

*TNFRSF11B* and *FGFBP1* genes, respectively, are similar to those published in the dbSNP database for a population of European descent (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The fact that the observed genotype frequencies are in Hardy–Weinberg equilibrium demonstrate that our study group is composed of a single population without substructure, which we had previously described using STRUC-TURE software [21].

In the present study, the rs312009 (C>T) polymorphism in the *LRP5* gene was strongly associated with bone phenotypes in a lumbar-spine site with a dominant inheritance model for the T allele, so that TT/TC women showed improved bone parameters (Tables 3, 4). This is consistent with previous work in our country, whereby postmenopausal women with the TT genotype showed higher LS-BMD than did women with the TC/CC genotype [31]. In that article, however, the authors assigned a recessive inheritance model so that women with the TT genotype (mean 0.925 g/cm<sup>2</sup>) showed higher LS-BMD than did TC and CC women, although within this group the TC women (mean 0.857 g/cm<sup>2</sup>) displayed improved bone compared with the CC women (mean 0.848 g/cm<sup>2</sup>). In any case, in both the present study as well as the study cited, the SNP rs312009 was associated with LS—but not with FN-BMD; women with the CC genotype were those who presented lower LS-BMD and, as shown in the present study (Table 5), had a higher risk of osteoporosis at the lumbar spine. Finally, although the SNP rs312009 was not previously associated in GWAS or meta-analyses, the *LRP5* locus has been on numerous occasions [11–14]. This reinforces the importance of the *LRP5* gene in bone metabolism as indicated by extreme bone phenotypes caused by mutations of gain and loss of function on this gene [9, 10].

A dominant inheritance model for the T allele of the rs312009 (C>T) polymorphism in the *LRP5* gene, as detected in the present study, may be more consistent with the functionality described previously for this genetic variant. Indeed, Agueda et al. [31] reported that rs312009

is located in the 5' region of the *LRP5* gene at a binding site for the transcription factor RUNX2 and, by gene reporter assays, the T allele was a better transcriber than was the C allele. This is probably because the T allele generates a sequence more similar to the consensus sequence for RUNX2. If these in vitro results were perfectly translatable to what occurs in vivo, increased transcription of the *LRP5* gene in women with 1 or 2 T alleles could result in increased BMD and thus would appear as a dominant inheritance model. In any case, it will require more experiments analyzing the in vitro rate of transcription or in vivo expression level of the *LRP5* gene for each genotype in order to establish which model is closer to reality.

In the present study we detected only a slight non-significant trend of association of the rs4876869 (A>G) polymorphism located in intron 2 of the *TNFRSF11B* gene to bone (mainly at the femoral neck). This negative result is in agreement with previous results in which no association was detected between this SNP and BMD when analyzed independently, although it was significantly associated ( $P = 0.01$ ) with BMD as part of a haplotype with two other SNPs of the exon 1 of the *TNFRSF11B* gene [20]. Despite this lack of association, Vidal et al. [20] had described this polymorphism as affecting *TNFRSF11B* gene expression so that the G allele increases the in vitro frequency of occurrence of exon 3 skipping, generating a shortened non-functional OPG protein, so that the carriers of this G allele should show impaired bone parameters, contrary to those found in the present study (Tables 3, 4). In any case, as Vidal et al. [20] indicated, having an A or G allele in the rs4876869 SNP is irrelevant since the risk of having low BMD is imposed by the C950T polymorphism located in the 5' untranslated region of the first exon of the *TNFRSF11B* gene. Although this SNP is not associated with bone phenotypes in either study, the locus *TNFRSF11B* has been repeatedly associated with bone phenotypes in GWAS and meta-analysis, showing the importance of the osteoprotegerin gene in bone

homeostasis [13, 14, 19]. In fact, in a recent review which analyzed more than 40 published GWAS on BMD in which 66 replicable loci were detected, only 7 of them, including the *LRP5* and *TNFRSF11B* loci, had been previously detected by association studies in candidate genes [6].

We have not detected an association between SNP rs12503796 located at the promoter region in the *FGFBP1* gene with bone. This agrees with the fact that, to date, this gene not has been described as being associated with bone phenotypes in any study except one [17]. In that study, the authors describe the SNP rs12503796 as functional since it resulted in decreased expression of *FGFBP1* and inhibited the upregulation of the gene by testosterone in vitro, which may contribute to variations in BMD. Although Hoppman et al. [17] describe weak associations of this polymorphism with several bone phenotypes in a Mexican-American discovery population and in an Amish replication population, they also report that the association is sex-stratified, so it is associated only with men, not with women. This agrees with the results we have provided in the present paper.

In conclusion, although the three polymorphisms analyzed in this study have been described as affecting the functional expression of their genes, and thus are able to contribute to variations in BMD, not all of them are associated in epidemiological and population studies. One possible explanation for this may be that although a particular variant alters gene expression in vitro, the overall rate of in vivo gene expression of a particular gene may depend upon many other regulatory elements, not only *in cis*, but also *in trans*. There are other sequences and genetic variants and transcription factors, and other epigenetic mechanisms, making the architecture of transcriptional variation for a given gene a complex process with many actors [32].

Finally, our results of association are in general agreement with previous results in other populations for these same polymorphisms, especially for those located in the *LRP5* and *FGFBP1* genes. Our results for SNP rs4876869 in the osteoprotegerin gene (*TNFRSF11B*) are similar to those found in a previous work for this SNP [20]. Nevertheless, the fact that we have not detected in our population an association with these SNPs in a gene clearly related to BMD may cause the present study to have low statistical power as a result of its small sample size or the type of cohort utilized, women, most of whom were postmenopausal. This may represent a limitation of the present study. In any case, we think it necessary to disclose the present results, whether they be positive or negative, in order to help avoid publication bias in those studies that attempt to replicate results obtained in different populations. This will help in the clarification and categorization of the genes that are most relevant in bone homeostasis in general and in the pathophysiology of osteoporosis in particular.

**Acknowledgments** The authors are indebted to Mrs N. Capafons, an undergraduate biology student, and to Mrs R. Aliaga for their excellent technical assistance. This work was supported by Grants PI09/0184 and PI12/02582 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain). Layla Panach is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Programa de Formación del Profesorado Universitario).

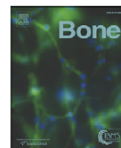
**Conflict of interest** All authors have no conflicts of interest.

## References

1. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R (2008) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19:399–428
2. Ralston SH, Uitterlinden AG (2010) Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 31:629–662
3. van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, Balcells S, Brandi ML et al (2008) Large-scale analysis of association between *LRP5* and *LRP6* variants and osteoporosis. *JAMA* 299:1277–1290
4. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D et al (2006) The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 145:255–264
5. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL et al (2006) Large-scale evidence for the effect of the *COL1A1* Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med* 3:e90
6. Hsu YH, Kiel DP (2012) Clinical review: genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1958–E1977
7. Uitterlinden AG, van Meurs JB, Rivadeneira F, Pols HA (2006) Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:16–26
8. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149:1192–1205
9. Johnson ML, Gong G, Kimberling W, Recker SM, Kimmel DB, Recker RB (1997) Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet* 60:1326–1332
10. Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P et al (1996) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet* 59:146–151
11. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL et al (2012) Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 44:491–501
12. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D (2007) Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet* 8:S14
13. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K et al (2009) Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* 151:528–537
14. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH et al (2009) Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 41:1199–1206
15. Agueda L, Velazquez-Cruz R, Urreizti R, Yoskovitz G, Sarrion P, Jurado S, Guerri R, Garcia-Giralt N, Nogueas X, Mellibovsky L, Diez-Perez A, Marie PJ, Balcells S, Grinberg D (2011)

- Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J Bone Miner Res* 26:1133–1144
16. Marie PJ, Debiais F, Hay E (2002) Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopathol* 17:877–885
  17. Hoppman N, McLenithan JC, McBride DJ, Shen H, Bruder J, Bauer RL, Shaffer JR, Liu J, Streeten EA, Shuldiner AR, Kammerer CM, Mitchell BD (2010) A common variant in fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1) is associated with bone mineral density and influences gene expression in vitro. *Bone* 47:272–280
  18. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS et al (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
  19. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N et al (2008) Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 371:1505–1512
  20. Vidal C, Formosa R, Xuereb-Anastasi A (2011) Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *J Mol Endocrinol* 47:327–333
  21. Pineda B, Hermenegildo C, Laporta P, Tarin JJ, Cano A, Garcia-Perez MA (2010) Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J Bone Miner Metab* 28:696–705
  22. Pineda B, Tarin JJ, Hermenegildo C, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA (2011) Gene-gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women. *Osteoporos Int* 22:1451–1458
  23. Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, Lin YJ, Wang HH, Yao A, Chen YT, Hsu CN (2006) FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 34:W635–W641
  24. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928–1929
  25. Gauderman WJ (2002) Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am J Epidemiol* 155:478–484
  26. Li WF, Hou SX, Yu B, Li MM, Ferec C, Chen JM (2010) Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet* 127:249–285
  27. Mitchell BD, Yerges-Armstrong LM (2011) The genetics of bone loss: challenges and prospects. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1258–1268
  28. Duncan EL, Brown MA (2010) Clinical review 2: genetic determinants of bone density and fracture risk—state of the art and future directions. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2576–2587
  29. Hardy J, Singleton A (2009) Genome wide association studies and human disease. *N Engl J Med* 360:1759–1768
  30. Pearson TA, Manolio TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299:1335–1344
  31. Agueda L, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Ciria M, Salo G, Carreras R, Nogues X, Mellibovsky L, Diez-Perez A, Grinberg D, Balcells S (2008) A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 23:1954–1963
  32. Mattick JS, Taft RJ, Faulkner GJ (2010) A global view of genomic information—moving beyond the gene and the master regulator. *Trends Genet* 26:21–28





Original Full Length Article

## Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: A functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women



Begoña Pineda<sup>a</sup>, Eva Serna<sup>b</sup>, Andrés Laguna-Fernández<sup>c</sup>, Inmaculada Noguera<sup>b</sup>, Layla Panach<sup>a</sup>, Carlos Hermenegildo<sup>a,c</sup>, Juan J. Tarín<sup>d</sup>, Antonio Cano<sup>e</sup>, Miguel Ángel García-Pérez<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Foundation, Institute of Health Research INCLIVA, Valencia, Spain<sup>b</sup> Research Unit – INCLIVA, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain<sup>c</sup> Department of Physiology, University of Valencia, Spain<sup>d</sup> Department of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, Spain<sup>e</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Spain<sup>f</sup> Department of Genetics, University of Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 October 2013

Revised 16 April 2014

Accepted 1 May 2014

Available online 9 May 2014

Edited by: Bente Langdahl

## Keywords:

Association studies

Translational research

Ovariectomy

Bone marrow

CD79A

GPX3 genes

## ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial skeletal pathology with a main genetic component. To date, however, the majority of genes associated with this pathology remain unknown since genes cataloged to date only explain a part of the heritability of bone phenotypes. In the present study, we have used a genome-wide gene expression approach by means of microarrays to identify new candidate genes involved in the physiopathology of osteoporosis, using as a model the ovariectomized (OVX) mice by comparing global bone marrow gene expression of the OVX mice with those of SHAM operated mice. One hundred and eighty transcripts were found to be differentially expressed between groups. The analysis showed 23 significant regulatory networks, of which the top five canonical pathways included B-cell development, primary immunodeficiency signaling, PI3K signaling in B-cells, phospholipase C signaling, and FcγRIIB signaling in B-cells. Twelve differentially expressed genes were validated by MALDI-TOF mass spectrometry with good reproducibility. Finally, the association to bone phenotypes of SNPs in genes whose expression was increased (*IL7R* and *CD79A*) or decreased (*GPX3* and *IRAK3*) by OVX in mice was analyzed in a cohort of 706 postmenopausal women. We detected an association of a SNP in a gene involved in the detoxification of free radicals like glutathione peroxidase 3 (*GPX3*) with femoral neck BMD (rs8177447,  $P = 0.043$ ) and two SNPs in the Ig-alpha protein of the B-cell antigen component gene (*CD79A*) with lumbar spine BMD (rs3810153 and rs1428922,  $P = 0.016$  and  $P = 0.001$ , respectively). These results reinforce the role of antioxidant pathways and of B-cells in bone metabolism. Furthermore, it shows that a genome-wide gene expression approach in animal models is a useful method for detecting genes associated to BMD and osteoporosis risk in humans.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The increased life expectancy that occurs not only in developed, but also in developing countries, has led to a higher incidence of degenerative disorders such as osteoporosis [1]. Osteoporosis is a common age-related systemic skeletal disease associated with low bone mineral density (BMD) and micro-architectural deterioration of bone tissue leading to an increased risk of bone-fragility fractures affecting both women and men [1]. Other features of this pathology are low bone mass, altered bone material composition and increased rates of bone

remodeling. Among all these phenotypes, BMD is the best predictor of bone fracture, the major complication of osteoporosis that is responsible of the morbidity and mortality associated with this pathology [2].

Osteoporosis is a multifactorial disease and according to the WHO, the phenotype that defines it, BMD, is influenced by environmental, medical, genetic and also epigenetic factors [3]. Certainly, there is abundant evidence obtained from studies in twins, families and in epidemiological studies which reveal a significant genetic contribution to phenotypic variation in BMD. This is true as well in other phenotypes that are predictors of bone fracture, like skeletal geometry, bone turnover or the ultrasound properties of bone, with estimates of heritability ranging between 0.5 and 0.8 [4–6].

To find the underlying genes that regulate susceptibility to low bone mass and osteoporosis, different strategies have been used, including

\* Corresponding author at: Department of Genetics, University of Valencia, C/Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Fax: +34 96 386 48 15.  
E-mail address: migarpe@uv.es (M.Á. García-Pérez).

linkage studies, studies of candidate genes with *a priori* hypotheses, hypothesis-free genome-wide association studies (GWAS), and functional studies [4]. Linkage studies, given the multifactorial nature of the common form of osteoporosis, are not the best approach to the study of this pathology because of the low penetrance of the character [7]. Thus, like other complex diseases, most reports have been *a priori* hypothesis association studies with candidate genes. This approach has focused mainly on genes regulating bone metabolism and cytokines whose implication in bone metabolism has been well-known for some time. For example, *ESR1*, *COL1A1*, *VDR*, *TGFB1*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *OPG*, and *LRP5* represent some of the approximately 150 candidate genes that have been investigated [4]. Recently, given the advances in high-throughput genotyping methods, GWAS have been performed in thousands of people comprising some 500,000–1,000,000 SNPs [8,9]. Although this type of approach has a number of known issues, e.g., its extreme cost, limited statistical power or that it explains only a small percentage of phenotypic variance [4,10], these studies provide the scientific community with the ability to work without prior hypotheses. In general, they all point to a few biological pathways: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, estrogen endocrine, RANKL/RANK/OPG, bone ossification, mesenchymal-stem-cell differentiation, osteoclast differentiation and the TGF-signaling pathways [8,9,11–13]. Nevertheless, there about 30 BMD GWAS loci which lack prior molecular or biological evidence of involvement [12]. Finally, another approach consists of trying to define the mechanisms that underlie the association with phenotype performance, for example, animal models in which the gene has been mutated, over-expressed or deleted [10].

In this paper, we have analyzed the global gene expression through microarrays in bone marrow of OVX mice and compared it with that of SHAM operated control mice to identify genes showing differential expression in response to the estrogen deficiency induced by OVX. We decided to study bone marrow since it is in the microenvironment of this tissue where the main cells involved in bone homeostasis are located and because it represents a direct target of the effect of estrogen depletion. With this approach, we have tried to reproduce one of the major risk factors for osteoporosis in women, the estrogen deficiency that occurs at menopause or after a bilateral ovariectomy [14]. To our knowledge, we are the first to develop this translational research approach for studying the genetics of postmenopausal osteoporosis. The method consists of first identifying differentially expressed genes in response to OVX in an experimental animal model, and second, studying the association of some human genes orthologous to those differentially expressed in mice with BMD, in a cohort of women in order to establish whether they are susceptibility genes to postmenopausal osteoporosis.

## Materials and methods

### Mice and treatments

Fifteen-week-old, skeletally mature female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were housed in an environmentally controlled laboratory upon arrival and acclimated for 3 days. After this period, the animals were either dorsal ovariectomized (OVX, N = 23) or sham operated (SHAM, N = 14) under general anesthesia using 0.1 mg/kg Butorphanol (Torbugesic, Fort Dodge Laboratories, Girona, Spain) as a pre-anesthetic, 5% isoflurane to induce anesthesia and 1.5% isoflurane as maintenance (Veterinaria Esteve, Barcelona, Spain), and maintained as previously described [15]. One mouse from the SHAM group died as a consequence of the intervention. None of the other mice exhibited evidence of infectious disease, impaired growth, immunosuppression, or other side effects.

Four weeks after surgery the mice were sacrificed to obtain the right femur, having assessed the success of ovariectomy, as previously described [15]. One mouse of the OVX group was discarded because it did not show the expected uterine atrophy. The bone marrow cells

were isolated from the femora of animals using centrifugation [16] then lysed immediately with 1 mL TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). All procedures for consideration of animal welfare were reviewed and approved by the ethical committee of our institution.

### RNA isolation and GeneChip expression analysis

Total RNA from bone marrow cells was extracted using the TRIzol reagent and was purified using the PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. All RNA samples inside the purification column were treated with RNase-Free DNase for removal of contaminating DNA (Invitrogen). Purified total RNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used as a template for cDNA synthesis. RNA integrity was assayed by means of the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm using a highly sensitive capillary spectrophotometer (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences). Equal amounts of purified RNA extracted from 13 SHAM-operated mice and from 22 OVX mice were pooled in three (SHAM) and five (OVX) pools, with each containing 4–5 different RNAs from individual mice. The generation of mRNA pools is a standard method to reduce the effect of biological replication [17]. Consequently, a total of 8 microarrays were developed and analyzed in the present study: three for SHAM mice (named C1–C3) and five for OVX mice (named O1–O5).

The synthesis of cDNA and cRNA, labeling, hybridization and scanning of the samples were performed as described by the GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix Ltd., UK), as previously described [18]. Twenty micrograms of fragmented biotinylated cRNA were used to prepare the hybridization cocktail and subsequently hybridized for 16 h at  $45^{\circ}\text{C}$  for the Affymetrix GeneChip Mouse Expression Array 430 2.0, which contains of 45,101 probe sets, representing over 14,000 well-characterized genes. Arrays were washed, scanned and analyzed to obtain CEL files from pixel values on the DAT files, as previously described [18]. Global differences between different samples (CEL files) were measured by principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA), and hierarchical clustering using the Partek Genomic Suite software (Agilent). For hierarchical clustering analysis, Pearson's dissimilarity was used to calculate row dissimilarity, and Ward's method was used for row clustering.

The analysis of significant changes in expression profiles of SHAM vs. OVX mice was done by GEPAS 4, a web-based tool (<http://www.gepas.org>) [19]. Briefly, for global background subtraction and cross array normalization, we used the Robust Multichip Average (RMA) method; for between array standardization methods, we used the quantiles tool, and for PM-MM adjustment we used the PM-only tool, and only PM values were taken into account [19]. The probe-set summary method was performed by using the median polish tool, which uses Tukey's median polish procedure to compute probe-set summaries. T-Rex was the tool used for analyzing differential gene expressions. It implements several modules to study gene expression under different experimental conditions. For each gene, this tool performs a t-test for the difference in mean expression between the two groups of arrays (SHAM and OVX), and T-statistics and P-values are reported. In the present work, significant genes from the comparison between SHAM and OVX mice were selected using the Benjamini–Hochberg method to control for a maximum false discovery rate (FDR) in the multivariate system. Only adjusted P-values  $<0.001$  and a FDR used to discriminate false positives in the multivariate system  $<0.15$  were considered as significantly different between groups.

The genes differentially expressed in response to OVX were visualized in biological pathways with the Ingenuity Pathways Analysis mapping software (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA; [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Data sets containing the Affymetrix probe set identifiers and T-statistics obtained from the t-test for the difference in mean expression between the two groups of arrays were uploaded to the application. In

our experiment a set of 180 genes identifiers of transcripts, which displayed a significant change in response to OVX as compared to control SHAM operated mice (FDR < 0.15;  $P < 0.0007$ ), were uploaded and analyzed, as previously described [18].

#### MassARRAY quantitative gene expression (QGE)

In order to validate the differential expression found in the microarray experiment, we performed real competitive PCR and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Sequenom, CA, USA) analysis using 4 replicates of each of the 12 different RNAs from each group of mice (SHAM or OVX) for 12 selected genes with 8 dilutions of competitor in each experiment. Likewise, a set of 4 housekeeping genes (*Gadph*, *Actb*, *Hprt1*, and *Tubb5*) were used as endogenous controls for gene expression normalization. For each gene, a 70–120 bp region of identical sequence with one single mismatch was chosen according to the analysis performed by the software. One microgram of total purified RNA was reverse transcribed into cDNA using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), following the manufacturer's instructions, with a mix of random hexamers and oligo(dT). Then, cDNA was diluted 1/10 in water, and 1  $\mu$ L of this dilution, along with the synthetic competitor having the single mismatch, served as templates for competitive PCR. All PCR primers and competitors were designed using the Multiplexed QGE Assay Design 3.4 software (Sequenom; Supplemental Table S1). The removal of excess dNTP, the primer extension reaction, and the RNA quantification were performed as described in the Sequenom application guide (<http://www.sequenom.com>).

#### Subjects

The study group we analyzed to assess the associations of SNPs with bone density in specific, differentially expressed genes obtained from the animal OVX model consisted of a postmenopausal female population of Spanish ancestry living in Valencia that are part of a cohort that we have regularly utilized in genetic association studies [20–22]. A total of 706 women with natural menopause, defined by at least 1 year of amenorrhea and follicle-stimulating hormone (FSH) level above 40 UI/mL, or subjected to a bilateral ovariectomy performed before menopause, consented to participate in the study and underwent genotyping. At the hospital, on the day of blood extraction to obtain DNA and/or serum, each woman received a questionnaire about osteoporosis risk factors, e.g., age, height and weight, cigarette smoking and use of hormone therapy (HT) or medications known to affect bone metabolism, and the data were recorded.

Women with a history of bone disease other than primary osteoporosis or who had used any medication known to alter bone mass, except for HT, were excluded from the study. Age, years since menopause (ysm), weight, smoking, and HT-use were used as covariates in the analysis of the data. The local ethics committee approved the study and protocol, and written informed consent was obtained from all women in accordance with the regulations of the INCLIVA Institute of Health Research and the Ethics Committee of our center.

#### Anthropometric and bone mineral density (BMD) data

The BMI was calculated for each participant as the ratio between weight (kg) and height squared ( $m^2$ ).

In the present study, almost all of the women underwent a densitometric study at femoral neck (FN) and at lumbar spine (LS) sites by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the non-dominant proximal FN (FN-BMD;  $N = 626$ ) and at the LS from L2–L4 (LS-BMD;  $N = 638$ ). We used a Norland XR-36 (Norland Medical Systems Inc.; Fort Atkinson, WI, USA) or Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA) densitometers. In order to manage BMD performed with two different densitometers, a standardized BMD (sBMD) was calculated [21,22], and "type of densitometer" was used as a covariate in the multivariate analysis.

#### Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and genotyping

In the present work, we decided to analyze the association of BMD in our cohort of women for polymorphisms belonging to 4 genes that showed differential expression after OVX in mice. Two genes, the serum glutathione peroxidase 3 gene (*GPX3*, plasma) and the interleukin-1 receptor-associated kinase 3 gene (*IRAK3*), showed a decreased expression in the bone marrow of the OVX mice, while the other two genes, the molecule immunoglobulin-associated alpha gene (*CD79A*) and the interleukin 7 receptor gene (*IL7R*), showed an increased expression after OVX. The genes were chosen because all except the *CD79A* gene have been previously associated with bone loss. That notwithstanding, none of these genes have been studied for an association with BMD in humans to date [23–25].

The dbSNP database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was explored to identify SNPs of the *GPX3*, *IRAK3*, *CD79A* and *IL7R* genes in the Caucasian population. Then, haplotype blocks were constructed with Haploview 4.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) using the Gabriel method [26]. SNPs were selected in different haplotype blocks looking for SNPs with adequate heterozygosity and with a minor allele frequency in Caucasians of >5% with the use of FastSNP (<http://fastsnp.bims.sinica.edu.tw/>), a web-based tool, to identify potentially functional SNPs in the genes.

Thus, for the *IL7R* gene (chromosome 5), the Haploview software detected a single haplotype block of 33 kb, and we selected three SNPs: rs6897932 (C>T, chromosome position, 35874575, Build 37), rs11567705 (C>G, 35861152) and rs2228141 (C>G, 35871273). For the *CD79A* gene (chromosome 19), the software showed no clear haplotype blocks, probably due to the low number of SNPs characterized in this region with adequate heterozygosity. We selected two SNPs in this gene: the rs3810153 (A>G, 42385469) and rs1428922 (G>A, 42379780). For the *GPX3* gene (chromosome 5), the software detected three haplotype blocks of 2 kb, 5 kb and less than 1 kb. We selected three SNPs belonging to the first two blocks: rs1946234 (A>C, 150399210), rs3792796 (G>C, 150402490), and rs8177447 (T>C, 150407456). Finally, for the *IRAK3* gene (chromosome 12), the analysis showed two haplotype blocks of 51 kb and 1 kb. We selected 6 SNPs in the larger block and one in the smaller one: rs1732887 (G>A, 66581616), rs1168771 (T>C, 66588836), rs1168760 (A>T, 66595850), rs2289134 (T>C, 66598687), rs1152888 (A>G, 66605228), rs1623665 (T>G, 66618182), and rs1152916 (A>T, 66635304). The analysis with FastSNP software showed a medium-high risk for rs1152888 SNP (*IRAK3*) because it could affect splicing sites, and a low-medium risk for rs6897932 and rs2228141 (*IL7R* gene) SNPs because they could affect splicing regulatory sites. For the remaining SNPs, the FastSNP software assigned a low risk of affecting gene expression.

Obtaining DNA from blood samples and genotyping SNPs by allelic discrimination using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were performed as previously described [22]. The reproducibility of the technique was approximately 100% and was estimated in each PCR by re-genotyping about 7–8% of the samples in each plate. In about 0–4% of the samples, we were unable to get a valid genotype. This was because of a poor amplification mainly as a result of the concentration or quality of the DNA. All these samples were re-genotyped by changing some of the protocol parameters: by increasing the amount of DNA in the PCR, by reducing the annealing temperature or by increasing the number of PCR cycles.

#### Statistical analysis

Beginning with the mouse experiments, we used the statistical tools included in the GEPAS 4 software. A *t*-test was used to detect differences in mean expression between the two groups of arrays (SHAM and OVX), reporting *t*-statistics and *P*-values. To control for a maximum false discovery rate (FDR) in the multivariate system, we used the Benjamini–Hochberg method and only adjusted *P*-values <0.0007 and



an FDR <0.15 were considered as significantly different between groups.

Then, to test the homogeneity of the participant women, genotypic frequencies for each polymorphism were tested against Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) proportions by standard  $\chi^2$  tests and with the use of SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snptest>) [27]. In addition, the presence of population stratification was evaluated with STRUCTURE software, running a dataset with five markers belonging to different chromosomes [28]. The model of inheritance (co-dominant, dominant, over-dominant and recessive) was analyzed with SNPStats. The significance threshold after a multiple test correction for each gene was estimated by considering the effective number of independent marker loci, using the single nucleotide spectral decomposition software (SNPSpD) developed by Nyholt [29].

Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) were used for comparisons of means between groups. Analysis of covariance (ANCOVA) and regression analysis were used to examine differences in BMD and in age-adjusted BMD (Z-score) according to genotype, after adjustment for confounder variables like age, ysm, weight, HT use (nonuser, user), smoking status (nonuser–user), and type of densitometer. ANCOVA analyses were corrected for multiple testing by Bonferroni's correction method (SPSS software). Automated binomial logistic regression analysis with forward stepwise variable selection was used to estimate the relative risk of osteopenia or osteoporosis according to the WHO definition (T-score  $\leq -1$ ). In each analysis, odds ratios (with 95% confidence intervals) adjusted by the above-mentioned confounder variables were calculated.

We estimated sample size of 686 as sufficient to get an 85% statistical power. This was done in order to detect a gene effect of  $R^2 = 0.013$  (estimated by regression analysis between LS-BMD and rs148922 SNP) according to a frequency for the A allele of 0.49 (Table 1) under a recessive model of inheritance and a mean  $\pm$  SD for LS-BMD of  $0.993 \pm 0.151$  g/cm<sup>2</sup> for the entire population (Table 2). We used the QUANTO software package (<http://hydra.usc.edu/GxE/>) [30] for this.

Values shown in the text, tables and figures are means  $\pm$  SD and frequencies, unless otherwise specified. All analyses were two-tailed, and significance was defined as  $P < 0.05$ , except when multiple comparisons were analyzed. The statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (version 19; SPSS Inc, Chicago, IL).

## Results

### Microarray and gene expression profile analysis of differentially expressed genes after OVX

To detect and quantify the differential gene expression induced by OVX, we used the T-Rex software (GEPAS suite) which, for each gene, performed a t-test for the difference in mean expression between the two groups of arrays. Subsequently, the analysis showed 180 significant transcripts (Supplemental Table S2), of which 120 genes were up-regulated (66.7%) and 60 genes (33.3%), were down-regulated. The sign of the T-statistics (Supplemental Table S2) indicates whether a given gene expression was up-regulated with OVX (plus sign) or down-regulated (minus sign).

Principal component analysis (PCA) was applied to detect the inter-relationships among the pools of samples used in the present study. PCA is an exploratory technique used to define the structure of high-dimensional data (e.g., microarray data) by reducing its dimensionality. The analysis of the projections of these components on spatial axes provides insight into the different patterns of gene expression in each group of samples. Fig. 1 shows the PCA for the eight experimental pools (5 pools for OVX mice and 3 pools for SHAM mice), and the mean for each group. It is clear that both groups are adequately separated into two sets, showing that the gene expression profiles in the mRNA pools of both groups are essentially different, although the samples

**Table 1**  
Genotypic and allele frequencies and HWE  $P$ -values for the polymorphisms analyzed.

Gene	SNP	Genotype	N (frequency)	Allele (frequency)	HWE $P$ -value
GPX3	rs1946234	A/A	571 (0.81)	A (0.90)	1.00
		A/C	127 (0.18)	C (0.10)	
		C/C	7 (0.01)		
	rs3792796	C/C	271 (0.39)	C (0.61)	0.20
		C/G	315 (0.45)	G (0.39)	
		G/G	112 (0.16)		
rs8177447	C/C	429 (0.61)	C (0.78)	0.91	
	C/T	244 (0.35)	T (0.22)		
	T/T	33 (0.05)			
IL7R	rs6897932	C/C	410 (0.58)	C (0.76)	0.35
		C/T	247 (0.35)	T (0.24)	
		T/T	45 (0.06)		
	rs11567705	C/C	408 (0.58)	C (0.76)	0.41
		C/G	247 (0.35)	G (0.24)	
		G/G	44 (0.07)		
rs2228141	C/C	483 (0.69)	C (0.83)	0.89	
	C/T	200 (0.28)	T (0.17)		
	T/T	19 (0.03)			
CD79A	rs3810153	A/A	240 (0.35)	A (0.59)	1.00
		A/G	331 (0.48)	G (0.41)	
		G/G	114 (0.17)		
	rs1428922	A/A	164 (0.23)	A (0.49)	0.29
		A/G	365 (0.52)	G (0.51)	
		G/G	172 (0.25)		
IRAK3	rs1732887	T/T	356 (0.51)	T (0.71)	0.41
		T/C	280 (0.40)	C (0.29)	
		C/C	64 (0.09)		
	rs1168771	C/C	129 (0.19)	C (0.41)	0.028
		C/T	306 (0.44)	T (0.59)	
		T/T	257 (0.37)		
rs1168760	A/A	616 (0.89)	A (0.94)	0.72	
	A/T	78 (0.11)	T (0.06)		
	T/T	1 (0.00)			
rs2289134	T/T	326 (0.47)	T (0.68)	0.082	
	T/C	282 (0.41)	C (0.32)		
	C/C	83 (0.12)			
rs1152888	A/A	1 (0.00)	A (0.06)	0.72	
	A/G	78 (0.11)	G (0.94)		
	G/G	622 (0.89)			
rs1623665	C/C	280 (0.40)	G (0.62)	0.025	
	G/G	300 (0.43)	T (0.38)		
	T/T	115 (0.17)			
rs1152916	A/A	193 (0.28)	A (0.53)	1.00	
	A/T	348 (0.50)	T (0.47)		
	T/T	155 (0.22)			

from the OVX group showed greater dispersion than did those from the SHAM controls. Hierarchical clustering collects similar entities into clusters, producing a dendrogram that shows the hierarchy of the clusters. In the present work, it was also used to analyze the expression

**Table 2**  
Anthropometric and bone characteristics of the Spanish postmenopausal female cohort studied (mean  $\pm$  SD or percentage).

	Number	Values
Age (year)	706	53.2 $\pm$ 6.6
Years since menopause (year)	706	6.2 $\pm$ 5.6
Weight (kg)	706	66.3 $\pm$ 11.3
Height (cm)	706	157.3 $\pm$ 6.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	706	26.8 $\pm$ 4.4
Smoking (%)	706	24.5
HT user (%)	706	34.6
Surgical menopause (%)	706	28.0
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	626	0.799 $\pm$ 0.122
FN T-score	626	-0.93 $\pm$ 1.05
FN Z-score	626	-0.09 $\pm$ 1.01
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	638	0.993 $\pm$ 0.151
LS T-score	638	-1.16 $\pm$ 1.41
LS Z-score	638	-0.24 $\pm$ 1.25

BMI, body mass index; HT, hormone therapy; BMD, bone mineral density; FN, femoral neck; and LS, lumbar spine.

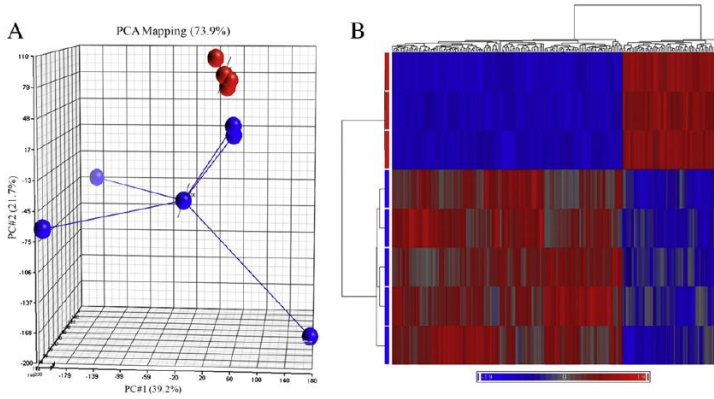


Fig. 1. A) Principal components analysis (PCA) and B) hierarchical clustering of transcriptome data from SHAM (red) and OVX (blue) mice.

profile between OVX and SHAM samples (Fig. 1). The results show that there is broad agreement on gene expression profiles among arrays hybridized with mRNA from SHAM mice and among arrays hybridized with mRNA from OVX mice. This result would be consistent with the image provided by the PCA analysis and, although there is some scatter in the pools of OVX mice, the gene expressions for both samples can be easily clustered.

*Identification and functional classification of differentially expressed genes induced by OVX*

In order to classify the OVX-induced genes in terms of their biological function, IPA software was used. This classification showed that OVX

altered the expression of genes involved in biological functions like skeletal and muscular diseases (62 genes), connective tissue diseases (45 genes), immunological diseases (49 genes), proliferation and cell growth (49 genes), function and development of the hematological system (35 genes), or those related to humoral immune response (22 genes), among others. The top five canonical pathways, based on their significance (*P*-value), included B-cell development ( $P = 1.3 \times 10^{-7}$ ), primary immunodeficiency signaling ( $P = 2.9 \times 10^{-6}$ ), PI3K signaling in B lymphocytes ( $P = 5.7 \times 10^{-5}$ ), phospholipase C signaling ( $P = 6.1 \times 10^{-5}$ ), and FcγRIIB signaling in B lymphocytes ( $P = 7.3 \times 10^{-4}$ ).

The IPA analysis showed 23 significant regulatory networks (score > 2), of which the 10 most significant (score > 12) are displayed in Supplemental Table S3. The number one ranked network (score =

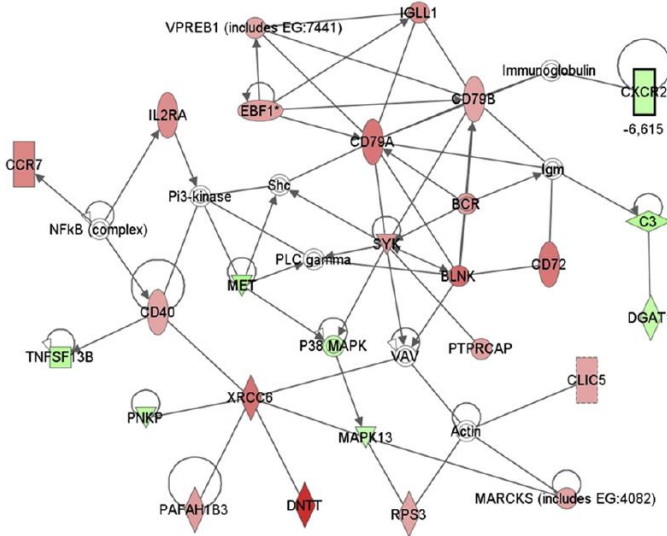


Fig. 2. The most significant network regulated by OVX in mice bone marrow. The intensity of the node color indicates the degree of up- (red) or down- (green) regulation. Only direct relationships between genes are represented.

43, focus genes = 25) (Fig. 2) is associated with cellular development, hematological system development and function, and humoral immune response. This network is focused on genes like the BCR (B-cell receptor) and its members CD79A and CD79B (immunoglobulin-associated alpha and beta antigens), BLNK (B-cell linker), SYK (spleen tyrosine kinase), and CD40 gene (TNF receptor superfamily member 5). All these genes participate in processes such as B-cell activation, B-cell differentiation, B-cell proliferation, B-cell receptor signaling pathway, humoral immune and inflammatory response, intracellular signal transduction pathways, and the positive regulation of bone resorption, among many others. Top functions of some other highly significant networks are associated with skeletal and muscular disorders (e.g., *Galnt3*, *Ebfl1*, *Ibsp*, *Gata1*, *Sox4*, or *Gh* genes), phospholipase C signaling, PI3K signaling in B lymphocytes, cell death, endocrine system disorders, lipid metabolism, cellular assembly and organization cell signaling, and hematological disease, among others (Supplemental Table S3).

#### Microarray analysis validation by MassARRAY QGE analysis

To validate the results obtained by the gene expression with microarray analysis, a MassARRAY QGE analysis was performed using the same RNA samples analyzed in the microarray experiment for 12 selected genes. In this case, though, the samples were analyzed individually instead of by pools (Table 3). For eight of the twelve genes examined using this technique, we detected significant differences between SHAM and OVX mice, indicating that the results of the microarray study provided reliable comparisons between both groups of mice. The significant differences were not 100%, probably due to dispersion in the molar concentration of RNA for some genes whose value ranged from  $10^{-16}$  to  $10^{-22}$  M.

#### Association studies of differentially expressed genes in the cohort of women

The main objective of this study was to find genes whose expression changes in response to OVX in order to analyze the association of these genes with bone phenotypes in our cohort of postmenopausal women using a translational approach. Consequently, we decided to study, in our cohort of women, the association of BMD with two genes that showed a lower expression in OVX mice (*GPX3* and *IRAK3*) and with two genes that showed an increased expression in OVX mice (*CD79A* and *IL7R*). Supplemental Fig. S1 shows the fluorescence intensity values for each pool of samples (blue: OVX; red: SHAM) showing that with OVX, gene expressions for *Irak3* and *Gpx3* were down-regulated, whereas the expressions for *Il7r* and *CD79a* were up-regulated.

**Table 3**

Validation of microarray results by MassARRAY QGE analysis (Sequenom). The T-statistics is the value obtained from the analysis of differential gene expression by T-Rex software (GEPAS suite). The ratio OVX/SHAM results from dividing the molar concentration of each gene in bone marrow between OVX mice (12 animals) and SHAM mice (12 animals) obtained with Sequenom. The PCR and competitor primers are shown in Supplemental Table S1.

Gene	T-statistics (GEPAS)	Ratio OVX/SHAM (Sequenom)	P-value (Sequenom)
<i>Dntt</i>	17.4	2.20	0.170
<i>Sox4</i>	12.7	2.35	0.099
<i>Il7r</i>	12.4	2.61	0.037
<i>Dpp4</i>	12.3	2.56	0.000058
<i>Blnk</i>	11.3	3.52	0.00027
<i>CD79a</i>	10.3	2.59	0.000025
<i>CD72</i>	10.2	2.31	0.002
<i>Capsl</i>	9.5	2.35	0.015
<i>Cpm</i>	8.2	2.88	0.00015
<i>Tnfrsf19</i>	6.9	2.08	0.148
<i>CD40</i>	6.5	1.82	0.320
<i>Gpx3</i>	-7.8	0.39	0.004

The main characteristics of the 706 participants in the study are listed in Table 2. Note that women displayed normal bone parameters according to their median age, showing a mild osteopenia at the lumbar spine site ( $T = -1.16 \pm 1.41$ ). Genotype, allele frequencies and the Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) *P*-values for the SNPs examined in the present study are shown in Table 1. The genotyping rate for the 15 SNPs analyzed was higher than 99%. The allelic frequencies were similar to those reported in other Caucasian populations, and the distribution frequencies for 13 of the 15 SNPs were consistent with the HWE. Two SNPs showed departures from HWE with nominal *P*-values <0.05 (0.028 and 0.025, respectively for the *IRAK3* gene). However, both were above the threshold significance of 0.009 after multiple test correction (Table 1). An analysis with STRUCTURE software showed data consistent with a single population ( $P > 0.99$ ), while models assuming two-to-five populations revealed negligible probabilities, which is incompatible with the existence of substructures or stratification in our population.

A preliminary study, by means of ANOVA (not shown), detected significant and/or suggestive associations of SNP rs8177447 in the *GPX3* gene with the femoral neck (FN)-BMD ( $P = 0.114$ ) and of SNPs rs3810153 and rs1428922 in the *CD79A* gene with the lumbar spine (LS)-BMD ( $P = 0.077$  and  $P = 0.018$ , respectively). The SNPstats software assigned a dominant model of inheritance to rs8177447 (dominant allele T,  $P = 0.048$ ) in the *GPX3* gene and recessive models of inheritance for both rs3810153 (recessive allele G,  $P = 0.047$ ) and rs1428922 (recessive allele A,  $P = 0.009$ ) in the *CD79A* gene. Consequently, women of the CT and TT genotypes for rs8177447 SNP, of the AA and AG genotypes for rs3810153 SNP and of the GG and GA genotypes for rs1428922 SNP were combined. Table 4 shows the FN and LS BMD and Z-scores according to these combinations, adjusted for the covariates age, ysm, weight, smoking, HT-user and densitometer type. Women with the CC genotype for rs8177447 showed significant bone deterioration at the FN site, although the same trend was also observed for the LS. Similarly, homozygous women for the G allele of rs3810153 and for allele A of rs1428922 showed lower bone parameters at the LS site than did the other women, with very clear bone deterioration for the latter SNP ( $P = 0.001$  and  $P = 0.002$  for the LS-BMD and LS-Z-score, respectively).

Finally, we conducted a multiple regression model, adjusting for age, ysm, BMI, densitometer type, HT use and smoking status, to evaluate the risk of FN and LS osteopenia or osteoporosis (Table 5). In this study, we selected women with osteopenia or osteoporosis because, in our population, less than 4.9% of women have FN osteoporosis ( $T < -2.5$ ). For FN, the odds ratio for osteopenia or osteoporosis for women of the CC genotype for rs8177447 compared with CT/TT women was slightly higher (OR: 1.5,  $P = 0.014$ ), but the risk for osteopenia or osteoporosis for women GG and AA for rs3810153 and rs1428922, respectively, was significantly higher (OR: 1.8 and 1.7, respectively).

## Discussion

### Antecedents and main purpose of the present study

In recent years dozens of GWAS have been carried out in order to identify genes involved in complex diseases. These studies, on the one hand, are increasing the number of genes associated with phenotypes of interest, often detecting unexpected pathways and genes. On the other hand, they are concluding that, among all the genes associated with a phenotype, we can explain only a small part of the total phenotypic variance of that phenotype. This, at least in part, may be a result of the huge imposition on the statistical treatment caused by the issue of multiple comparisons. It may also be revealing that the methodological approach which uses common variants for association analysis has reached its limit, and that other approaches need to be considered. Some of these alternatives to find the missing heritability could be the study of rare variants, the management of functional tests for the search



**Table 4**

FN- and LS-BMD and Z-scores adjusted by age, ysm, weight, smoking, HT-user and densitometer type in our population according to rs18177447 (*GPX3*), rs3810153 (*CD79A*) and rs1428922 (*CD79A*) SNP genotypes. Values are mean ± SEM. The P-value is the value calculated by the statistical software after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons.

Locus	Femoral neck		Lumbar spine	
	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	Z-score	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	Z-score
rs18177447 ( <i>GPX3</i> )				
CC	0.793 ± 0.006	-0.16 ± 0.05	0.990 ± 0.007	-0.29 ± 0.06
CT/TT	0.813 ± 0.008	0.02 ± 0.07	1.002 ± 0.009	-0.16 ± 0.08
P-value	0.043	0.031	0.331	0.202
rs3810153 ( <i>CD79A</i> )				
AA/AG	0.805 ± 0.005	-0.06 ± 0.04	1.001 ± 0.006	-0.19 ± 0.05
GG	0.786 ± 0.011	-0.23 ± 0.10	0.964 ± 0.014	-0.48 ± 0.12
P-value	0.134	0.107	0.016	0.024
rs1428922 ( <i>CD79A</i> )				
GG/GA	0.805 ± 0.005	-0.06 ± 0.05	1.005 ± 0.007	-0.16 ± 0.06
AA	0.789 ± 0.010	-0.20 ± 0.09	0.959 ± 0.012	-0.52 ± 0.10
P-value	0.168	0.139	0.001	0.002

and identification of candidate genes or the analysis of underlying epigenetic mechanisms [31].

The present study represents an example of translational research that aims to identify genes associated with osteoporosis using one of these alternative methodologies. Indeed, we have analyzed the changes in global gene expression induced by OVX in mouse bone marrow in order to identify potential candidate genes to translate the study to our cohort of women. The reasons for choosing this animal model have been the knowledge that estrogen deficiency is the primary cause of osteoporosis in women [14], the fact that mice subjected to OVX is widely accepted as a valid approach to study this deficit, and because our group already had previous experience with this model [15, 32,33].

*Genes and pathways altered in mouse bone marrow after ovariectomy*

We have detected 180 genes whose expression changed due to the OVX, most of them experiencing an up-regulation, as previously described [34]. In order to confirm the validity of the microarray experiment, we have used MassARRAY QGE (Sequenom) analysis, and we obtained statistical significance in eight of the twelve genes analyzed. For the other four genes, there was a trend among the microarray and Sequenom results, as the OVX/SHAM ratios and P-values show (Table 3). We consider that there are two main reasons for this non-absolute correlation. The first one is that in the Sequenom study, individual mRNAs were used instead of pools. The second one is that for some transcripts, molar concentration was very low and therefore, highly variable, which makes it more difficult to reach statistical significance when using individual mRNAs.

Canonical pathway analysis revealed the B-cell differentiation, development and activation as the most significant signaling pathways in bone marrow of mice one month after OVX (Supplemental Table S3 and Fig. 2). Among the genes whose expression was changed with the OVX in this most significant signaling pathway, there are genes involved in B-cell signal transduction (*Bcr*, *Blnk*, *CD79a*, *CD79b*, *Syk*), in B-cell differentiation (*Vpreb1*, *Igll1*, *Ebf1*, *Syk*, *Dntt*) and in B- and T-cell activation (*Ptprcap*, *Tnfrsf13b*, *Mapk13*, *Il2ra*, *CD40*, *Ccr7*). It is well-known that

estrogen deficiency induces B-lymphopoiesis [33,35], a process that could be implicated in bone loss associated with this deficiency, although the participation of B-cells in bone loss is controversial. For example, it has been reported that the administration of IL7 to the mouse induces B-lymphopoiesis and osteoclastic bone destruction [36], that mature B-cells and their precursors can express RANKL [37], that B-cell precursors have the capacity to differentiate directly into bone-resorbing osteoclasts [38], and that the depletion of B-cells in patients with rheumatoid arthritis suppresses bone turnover [39]. To the contrary, it has been reported that ovariectomy-induced bone loss occurs independently of B-cells [40], that B-cells are the main producers of the anti-osteoclastogenic factor OPG, that B-cell knockout mice are osteoporotic [41], and that mature peripheral blood B-cells inhibit osteoclast formation in an *in vitro* model of human osteoclastogenesis by a mechanism involving TGF-β [42]. Despite this controversy, it is accepted that activated B-cells may be potent regulators of bone resorption [43]. In fact, the *Il2ra* (CD25) gene, which is a marker of cell activation, is up-regulated in the present study and as previously described [32,33], indicating that OVX induces activation of B- and T-cells [44].

*Previous associations with bone metabolism of some genes altered after ovariectomy*

Whatever the role of B-cells in the regulation of bone homeostasis, in the most significant canonical pathway there are genes which have been previously associated with bone metabolism (Supplemental Table S3). Thus, for example, *Syk* and *Blnk* genes (both up-regulated by OVX) intervene in the regulation of osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals [45], the *in vivo Fbfl1* (up-regulated) overexpression in osteoblasts results in suppressed bone formation [46], and the *Marcks* gene (up-regulated) is necessary for the regulation of bone resorption through protein kinase C-delta (PKCδ) [47]. The behavior (up- or down-regulation) that these genes have shown in the bone marrow of ovariectomized mice would be consistent with the increased bone loss established after OVX. Other genes not included in this most significant canonical pathway have also been previously associated with bone phenotypes. Thus, for example, *Ibsp* (down-regulated), *Galn3* (down-regulated) and *Sox4* (up-regulated) genes were found to be associated with bone phenotypes in a recent GWAS with replication in two independent datasets [48]. Similarly, *Foxp1* (up-regulated), *Plcb1* (down-regulated), *Dpp4* (up-regulated), *Sox5* (up-regulated), *Mapk13* (down-regulated) and *Clic5* (up-regulated), among others, have been reported to regulate the activity of cells involved in bone homeostasis, in fracture healing and in bone loss in certain circumstances like OVX [49–54]. Of interest is the increase in CD40 expression induced by OVX. Our group has previously described the association of polymorphisms in CD40 and CD40L genes with bone mass and osteoporosis risk [22,55]. The system formed by CD40/CD40L is essential to the

**Table 5**

Estimation of risk for FN and LS osteopenia or osteoporosis, adjusted by age, ysm, weight, smoking, HT-user and densitometer type, according to genotypes that were associated with BMD.

Site	Genotype	P-value	Odds ratio	95% CI
Femoral neck	CC vs. CT/TT (rs18177447)	0.014	1.548	1.090–2.196
Lumbar spine	GG vs. AA/AG (rs3810153)	0.012	1.816	1.139–2.894
	AA vs. GG/GA (rs1428922)	0.013	1.706	1.121–2.597

immune response but also seems to be so to bone metabolism. In fact, CD40- and CD40L-deficient mice have an osteopenia similar to that of children with Hyper-IgM syndrome as a result of mutations in the CD40L gene [41,56]. The mechanism by which the CD40/CD40L system intervenes in bone metabolism is not fully elucidated. It is known, for example, that signaling through CD40 induces the expression of OPG by B-cells, but it has also been described that when T-cells are activated, as is the case in the OVX or in the continuous administration of PTH, signaling through CD40 expressed in osteoblasts or mesenchymal cells induce pro-osteoclastogenic signals and bone loss [41,44,57].

#### *Translating the results achieved in the animal model to our cohort of women*

After the analysis of global gene expression in the mouse, we selected four genes for further study, analyzing their association with BMD in our cohort of postmenopausal women. The main criterion for this selection, based on our present knowledge, was that gene function has a potential physiological relevance to bone function. With this premise, two down-regulated genes (*GPX3*, serum glutathione peroxidase 3; and *IRAK3*, interleukin-1 receptor-associated kinase 3) and two up-regulated genes (*CD79A*, immunoglobulin-associated alpha gene; and *IL7R*, interleukin 7 receptor), were selected. All of the genes except the *CD79A* gene have been previously associated with bone metabolism [23–25], although none of these genes has been studied in epidemiological studies of osteoporosis. *CD79A* was selected because it seems to have an important role in the most significant canonical network (Fig. 2).

Two of the studied genes in this translational approach were significant in our cohort of women (Tables 4 and 5). The *GPX3* gene codifies for the serum glutathione peroxidase 3, an enzyme that is decreased in aged osteoporotic female rats [25] and in mice subjected to OVX (the present study). This enzyme intervenes in the detoxification of hydrogen peroxide so it is an important barrier against reactive oxygen species (ROS) and their consequences for cell function. Indeed, it is well-known that ROS may contribute to aging and osteoporosis resulting from marked decreases in plasma antioxidants in aged women and men, and that the loss of estrogens or androgens diminishes defenses against oxidative stress in bone. This explains, in part, increased bone resorption when this hypogonadism arises [58]. Consequently, the decrease of *GPX3* in bone marrow of OVX mice observed in the present study supports the involvement of this enzyme in bone loss due to estrogen deficiency and reinforces the importance of ROS in bone homeostasis. Regardless of this, the SNPstats software assigned a low risk to the SNPs of this gene, so it is not likely to be a functional polymorphism. Rather, it may be in linkage disequilibrium with other variants of the *GPX3* gene or other causative genes near the region, like *TNIP1* (TNFAIP3 interacting protein 1) which has been associated with pathologies such as rheumatoid arthritis.

The other gene associated with bone phenotypes in our cohort of women was *CD79A* (Ig-alpha, immunoglobulin-associated alpha; Tables 4 and 5). This protein together with Ig-beta is necessary for the expression and function of the B-cell antigen receptor (BCR). Binding of an antigen to the BCR brings about antigen-BCR endocytosis, its processing, and the resulting peptides being loaded onto MHC class II genes (MHCI) for presentation to CD4 T-cells. Thus, *CD79A* functions may be related to bone loss from OVX according to the hypothesis proposed previously. Indeed, Pacifici [59] proposed that among the mechanisms responsible for OVX-induced bone loss, there is an expansion in the bone marrow of activated T-cells that produce TNF. This is the result of an expansion of mature T-cells in the periphery, which is a consequence of an increase in antigen presentation from the increased expression of MHCI. This, in turn, is driven by a complex mechanism that involves an increased production of IFN- $\gamma$  and IL-7, a blunted production of TGF- $\beta$  in bone marrow, and an increase in oxidative stress

[59]. One possibility could be that the variants described in the present paper, e.g., the rs1428922 SNP located in 5' near of *CD79A* gene or other variants in linkage disequilibrium, may cause changes in the expression of the *CD79A* gene. This, consequently, alters parameters related with the activation or presentation processes of these antigen presenting cells (APCs) that confer differential susceptibility to osteoporosis. That notwithstanding, in the future it will be necessary to perform both a gene-wide association study, increasing the number of SNPs, as well as a functional analysis of the SNPs shown to be associated.

#### *Limitations and potential biases of the present study*

Our study has some limitations. We used whole bone marrow to compare global gene expression between OVX and SHAM mice instead of isolating a particular cell type, e.g., osteoblasts. Our aim, by designing the experiment in this way, was to minimize the steps between animal sacrifice and the obtention of RNA in order to obtain high quality RNA. Moreover, the animals were sacrificed one month after OVX when the main changes that affect bone metabolism had already occurred. By that time, there are also other changes previously described by us [32, 33]. The reason for not choosing the first post-OVX days was to avoid changes in gene expression due to surgery inflammation. Moreover, the model is more similar to women's lives 5–10 years after menopause. There are other limitations. The study included Caucasian postmenopausal women so it is unclear whether the results can be extrapolated to women of a different ethnicity or to men. Additionally, the sample size was medium, although with good statistical power. Moreover, the design of the study was clinical and volunteer based, not population based. Finally, we have no information about participant dietary habits and physical activity.

To avoid false positives in our association study, we analyzed a population of a particular geographic region, having discarded substructures and women of other ancestry, and we have used covariates in the statistical analysis and a multiple test-corrected threshold for statistical significance to diminish the error type I risk related to the multiple SNPs analyzed. Therefore, although we tried to avoid potential biases, some may remain. Further studies with a prospective design and in other cohorts are needed to clarify these issues and to assess the real importance of our findings.

#### **Conclusion**

In conclusion, the present study presents a translational approach to the study of genes. It can be used as a tool in the search and identification of new genes associated with osteoporosis in complement with expensive GWAS. We have successfully validated this methodological approach by translating the study of variants in genes *GPX3* and *CD79A* with the bone phenotypes in our cohort of postmenopausal women. Our findings in the association study reinforce the role of antioxidant pathways and of B-cell function in bone homeostasis. This reinforces the need to further study genes of these systems and their relation to postmenopausal osteoporosis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.05.001>.

#### **Acknowledgments**

The authors are indebted to Mrs. R. Aliaga for their excellent technical assistance. This work was supported by grants PI09/0184 and PI12/02582 from the Fondo de Investigación Sanitaria (IS, Madrid, Spain), including funds from FEDER Program from EU. Layla Panach is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Programa de Formación del Profesorado Universitario).

Authors' roles: Study design: MAG-P and BP. Study conduct: BP, IN, ES, AL-F, JJT, CH, AC, and MAG-P. Data collection: BP, ES, IN,



AL-F, LP, and MAG-P. Data analysis: AL-F, ES, JTT, BP, CH, AC and MAG-P. Data interpretation: BP, ES, AL-F, LP, AC, CH, JTT, and MAG-P. Drafting or critically revising the manuscript: BP, ES, AL-F, IN, LP, CH, JTT, AC and MAG-P. All authors approved the final version of manuscript to be published.

## Disclosures

All authors state that they have no conflicts of interest.

## References

- [1] Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008;19:399–428.
- [2] Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007;18:1033–46.
- [3] Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics* 2012;13:252–63.
- [4] Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:629–62.
- [5] Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:303–26.
- [6] Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 2006;20:2492–506.
- [7] Ioannidis JP, Ng MY, Sham PC, Zintzaras E, Lewis CM, Deng HW, et al. Meta-analysis of genome-wide scans provides evidence for sex- and site-specific regulation of bone mass. *J Bone Miner Res* 2007;22:173–83.
- [8] Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41:15–7.
- [9] Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41:1199–206.
- [10] Uitterlinden AG, van Meurs JB, Rivadeneira F, Pols HA. Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:16–26.
- [11] Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44:491–501.
- [12] Hsu YH, Kiel DP. Clinical review: genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1958–77.
- [13] Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008;371:1505–12.
- [14] Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763–73.
- [15] Cano A, Dapia S, Noguera I, Pineda B, Hermenegildo C, del Val R, et al. Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos Int* 2008;19:793–800.
- [16] Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 2000;106:1229–37.
- [17] Kendziora CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Bioinformatics* 2003;4:465–77.
- [18] Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Laguna-Fernandez A, Bueno C, García-Pérez MA, et al. Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:96–103.
- [19] Tarraga J, Medina I, Carbonell J, Huerta-Cepas J, Minguez P, Alloza E, et al. GEPAS, a web-based tool for microarray data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W308–14.
- [20] Pineda B, Hermenegildo C, Tarin JJ, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA. Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with an increased risk of spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2010;93:1809–15.
- [21] Pineda B, Hermenegildo C, Laporta P, Tarin JJ, Cano A, Garcia-Perez MA. Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J Bone Miner Res* 2010;28:696–705.
- [22] Pineda B, Tarin JJ, Hermenegildo C, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA. Gene-gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women. *Osteoporos Int* 2011;22:1451–8.
- [23] Li H, Cuartas E, Cui W, Choi Y, Crawford TD, Ke HZ, et al. IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J Exp Med* 2005;201:1169–77.
- [24] Hartgring SA, van Roon JA, Wenting-van WM, Jacobs KM, Jahangier ZN, Willis CR, et al. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2595–605.
- [25] Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Iizuka T, Nishihira J, Tabe G, et al. The effect of vitamin K2 on bone metabolism in aged female rats. *Osteoporos Int* 2005;16:1604–10.
- [26] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263–5.
- [27] Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928–9.
- [28] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945–59.
- [29] Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004;74:765–9.
- [30] Gauderman WJ. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am J Epidemiol* 2002;155:478–84.
- [31] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747–53.
- [32] Garcia-Perez MA, del Val R, Noguera I, Hermenegildo C, Pineda B, Martinez-Romero A, et al. Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:807–19.
- [33] Garcia-Perez MA, Noguera I, Hermenegildo C, Martinez-Romero A, Tarin JJ, Cano A. Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum Reprod* 2006;21:880–7.
- [34] Xiao Y, Fu H, Prasadam I, Yang YC, Hollinger JO. Gene expression profiling of bone marrow stromal cells from juvenile, adult, aged and osteoporotic rats: with an emphasis on osteoporosis. *Bone* 2007;40:700–15.
- [35] Masuzawa T, Miyaura C, Onoe Y, Kusano K, Ohta H, Nozawa S, et al. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 1994;94:1090–7.
- [36] Miyaura C, Onoe Y, Inada M, Maki K, Ikuta K, Ito M, et al. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9360–5.
- [37] Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol* 2006;176:625–31.
- [38] Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:125–30.
- [39] Wheeler G, Hogan VE, Teng YK, Tekstra J, Lafeyre PP, Huizinga TW, et al. Suppression of bone turnover by B-cell depletion in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 2011;22:3067–72.
- [40] Li Y, Li A, Yang X, Weitzmann MN. Ovariectomy-induced bone loss occurs independently of B cells. *J Cell Biochem* 2007;100:1370–5.
- [41] Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 2007;109:3839–48.
- [42] Weitzmann MN, Roggia C, Toraldo G, Weitzmann L, Pacifici R. Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1643–50.
- [43] Horowitz MC, Fretz JA, Lorenzo JA. How B cells influence bone biology in health and disease. *Bone* 2010;47:472–9.
- [44] Li JY, Tawfeek H, Bedi B, Yang X, Adams J, Gao KY, et al. Ovariectomy deregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:768–73.
- [45] Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* 2008;132:794–806.
- [46] Kiviranta R, Yamana K, Saito H, Ho DK, Laine J, Tarkkonen K, et al. Coordinated transcriptional regulation of bone homeostasis by Ebf1 and Zfp521 in both mesenchymal and hematopoietic lineages. *J Exp Med* 2013;210:969–85.
- [47] Cremasco V, Decker EC, Stumpo D, Blackshear PJ, Nakayama KI, Nakayama K, et al. Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2012;27:2452–63.
- [48] Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Le PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncation selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 2011;7:e1001372.
- [49] Edwards JC, Cohen C, Xu W, Schlesinger PH. c-Src control of chloride channel support for osteoclast HCl transport and bone resorption. *J Biol Chem* 2006;281:28011–22.
- [50] Zhang Z, Shively JE. Acceleration of bone repair in NOD/SCID mice by human mononuclear cells, novel LL-37-activated monocytes. *PLoS One* 2013;8:e67649.
- [51] Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, et al. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 2013;288:9924–32.
- [52] Kyle KA, Willett TL, Baggio LI, Drucker DJ, Grynpas MD. Differential effects of PPAR-gamma activation versus chemical or genetic reduction of DPP-4 activity on bone quality in mice. *Endocrinology* 2011;152:457–67.
- [53] Seo E, Basu-Roy U, Zavadi J, Basilio C, Mansukhani A. Distinct functions of Sox2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage. *Mol Cell Biol* 2011;31:4593–608.
- [54] Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 1997;272:11902–7.
- [55] Pineda B, Laporta P, Hermenegildo C, Cano A, Garcia-Pérez MA. A C-T polymorphism located at position-1 of the *Kozak* sequence of *CD40* gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008;19:1147–52.
- [56] Lopez-Granados E, Temmerman ST, Wu L, Reynolds JC, Follmann D, Liu S, et al. Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5056–61.
- [57] Gao Y, Wu X, Terachi M, Li JY, Grassi F, Galley S, et al. T cells potentiate PTH-induced cortical bone loss through CD40 signaling. *Cell Metab* 2008;8:132–45.
- [58] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:266–300.
- [59] Pacifici R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss—revisited. *J Bone Miner Res* 2012;27:231–9.

## Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture

Layla Panach<sup>1</sup> · Damián Mifsut<sup>2</sup> · Juan J. Tarín<sup>3</sup> · Antonio Cano<sup>4</sup> · Miguel Ángel García-Pérez<sup>1,5</sup>

Received: 14 May 2015 / Accepted: 3 July 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Osteoporosis is a common skeletal disorder characterized by increased risk of bone fracture (BF) due to fragility. BFs, particularly hip fracture, are a major concern in health care because of the associated morbidity and mortality, mainly in the elderly. Lately the involvement of epigenetic mechanisms in the pathophysiology of many diseases has been recognized. In this context, the identification of microRNAs (miRNAs) specific to BF should represent a substantial step forward in diagnostics and therapeutics. The present study aimed to identify specific miRNAs in osteoporotic BF patients compared to those in osteoarthritic controls. In the profiling stage, total RNA was extracted from serum, two pools were prepared, and then retro-transcribed in triplicate. Levels of 179 serum miRNAs were analyzed by real-time PCR, and 42 of them showed significance ( $P < 0.05$ ), and 12 passed the false

discovery rate test for multiple comparisons. Six miRNAs were selected for the replication stage and individually analyzed in sera from 15 BF patients and 12 controls. Results showed that 3 miRNAs (miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p) were valuable upregulated biomarkers in BF with respect to controls and, significantly, their levels were not affected by hemolysis. For miR-21-5p, the difference detected between groups was independent of age ( $P = 0.005$ ) and its levels correlated to those of CTx ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.00001$ ), a marker of bone resorption. In conclusion, several miRNAs may be biomarkers of BF, particularly miR-21-5p. Further studies are needed in order to better characterize the levels of these miRNAs in other bone diseases and to elucidate the mechanism involved in the association of these three miRNAs with osteoporotic BF.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00223-015-0036-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miguel Ángel García-Pérez  
migarpe@uv.es

<sup>1</sup> Research Foundation, Institute of Health Research INCLIVA, Av. Menéndez Pelayo, 4 Accesorio, 46100 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Orthopedic Surgery and Traumatology, Clinic Hospital, Institute of Health Research INCLIVA, 46100 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain

<sup>5</sup> Department of Genetics, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

**Keywords** miRNA · Bone fracture · Osteoporosis · Biomarker

### Introduction

Osteoporosis is a systemic skeletal disease associated with low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue that is associated with an increased risk of bone fracture (BF). Indeed, the main clinical consequence of osteoporosis is BF due to fragility. By far, hip fracture has the worst consequences for the morbidity, disability, and mortality of patients, usually requiring hospitalization [1]. The estimated direct cost of all osteoporotic fractures in the EU for 2010 is 38.7 billion euros, including 43,000 deaths, half of these corresponding to hip fractures. Of these deaths, 20–30 % are causally related to the fracture event and occur 3–6 months post-event [1, 2].

Osteoporosis is a multifactorial disease resulting from complex interactions between genetic and environmental factors and lifestyle. Family and twin studies have reported high heritability for bone phenotypes such as BMD, bone geometry, and even BF, while stressing the importance of genetic factors in the pathology [3]. In this regard, there have been many candidate gene studies and GWAS so far that have detected dozens of genes associated with these phenotypes. Nevertheless, all together they account for less than 10 % of the phenotypic variance (heritability) for BMD [4].

In recent years a new discipline, epigenetics has developed. It attempts to explain the transmission of stable phenotypes without an alteration of the DNA sequence as a result of interactions between the internal and external environments and the genome. Of the epigenetic mechanisms, DNA methylation, chemical modification of histones (histone code), chromatin remodeling, and microRNAs (miRNAs) stand out [5]. The miRNAs are small non-coding RNAs, about 20–24 nucleotides in length, that negatively regulate gene expression and are involved in normal biological functions including proliferation, differentiation, and apoptosis [6]. They directly modulate the gene expression of mRNA genes through the formation of an RNA-induced silencing complex (RISC), which leads to mRNA target cleavage and degradation and/or to translation repression [7]. Each miRNA can have multiple target genes, and each gene may be regulated by more than one miRNA. Although not yet well characterized, more than 2500 miRNAs have been described.

Increasingly, alterations in epigenetic mechanisms underlying not only certain pathologies, mainly neoplastic ones, but also those of other entities, are being described [8]. Certainly, this also includes miRNAs. In fact, the first description of alterations in the levels of some miRNAs occurred in B cell leukemia [9]. Thereafter, circulating miRNA signatures as biomarkers of various cancers are being studied. This has revealed their important diagnostic and prognostic potential [10]. In skeletal diseases, the role of these miRNAs is not known in depth, although the functions of some of them, and the deregulation of miRNA-mediated mechanisms is emerging as an important pathological factor in bone degeneration [11].

The main predictor of bone fracture is the determination of BMD, although there are other important factors such as bone quality and geometry. This is manifest from the overlapping of BMD in patients with and without fragility fractures. In addition, a monitoring of 1–2 years is needed in order to follow the disease progression. The annual changes in BMD are of the same order of magnitude as the measurement accuracy [12]. The availability of reliable serum markers of BF risk would be a great achievement for the making of diagnoses and for tracking disease

progression. Currently, biochemical markers of bone remodeling derived mainly from the synthesis and degradation of type I collagen and other osteoblast functions are being used [13]. In any case, the specificity and sensitivity of the current markers is not fully established. To be provided with biomarkers based on serum miRNA signatures would ease determination and, unlike current markers, would inform on the cellular and molecular processes involved. This would result in a better choice of treatment.

The aim of the present study was to identify differentially expressed miRNAs in the serum of patients with hip BF, the fracture with worse prognosis, with respect to that of the controls with osteoarthritis also undergoing surgery for hip prosthesis implantation. The rationale for choosing these individuals as controls is that are patients subjected to the same type of surgery, in the same anatomical site under the same anesthesia, in order to equate the variables between groups to the maximum.

## Materials and Methods

### Study Subjects

Participating subjects were Caucasian women living in Valencia, Spain, in the area corresponding to the Hospital Clínico. The study subjects included women with osteoporotic subcapital hip fracture (cases) and women with severe osteoarthritis of the hip that required the implantation of a hip prosthesis (controls). Women with a history of bone disease other than primary osteoporosis or osteoarthritis, those who had fractures due to high-energy trauma, those who had used any medication known to alter bone metabolism, those with cancer, or those under 50 years of age were excluded from the study. The Clinical Research Ethics Committee approved this study, and the women read and signed an informed consent according to the regulations of the Institute of Health Research, INCLIVA.

### Anthropometric, Biochemical, and Bone Density Measurements

A blood sample under fasting conditions was obtained from participants to obtain serum. An aliquot of serum was used for biochemical determinations, and the rest was kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for analysis of miRNAs.

The levels of carboxy-terminal telopeptides of type I collagen (CTx), 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>), and osteocalcin were measured by electrochemiluminescence (E170 Modular Analyzer, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Levels of the isoform of bone alkaline phosphatase (BAP) were measured by the



chemiluminescence immunoassay (DiaSorin LIAISON BAP OSTASE assay). Levels of total alkaline phosphatase (ALP), intact parathyroid hormone (PTH), and total calcium and phosphate were determined by routine methods using an autoanalyzer (Olympus 5400, Tokyo, Japan).

For most of the participating women, we had recent densitometric data from their clinical histories. When that was not the case, the doctor who attended them requested the data. The quantification of bone mineral density (BMD,  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) was performed using dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the non-dominant proximal femoral neck (FN-BMD), unless this one was the fractured hip, and at the lumbar spine (L2-L4, LS-BMD) using a Lunar DPX densitometer (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA).

The BMI was calculated for each participant as the ratio between weight (kg) and height squared ( $\text{m}^2$ ).

### RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Quality Control

In all the serum samples used, the presence of oxyhemoglobin was assayed. This was done since it has been described that hemolysis affects the levels of certain miRNAs [14]. Therefore, the absorbance at 414 nm was quantified spectrophotometrically. At the profiling stage, samples with an absorbance  $>0.2$  were discarded as this is the cutoff at which a sample is considered to be hemolyzed.

There was an independent total RNA extraction performed for each serum sample using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). As a quality control during the procedure, and in order to determine the efficiency of RNA extraction, three synthetic RNAs (spike-ins: UniSP2, UniSP4, and UniSP5) were added at concentrations recommended by the manufacturer (EXIQON). Briefly, the serum was thawed on ice and centrifuged 5 min at 3000 g at 4 °C. Of the supernatant 200  $\mu\text{L}$  of serum were taken, the spike-ins were added and mixed with 750  $\mu\text{L}$  QIAzol containing 1.25 mg/mL bacteriophage MS2 RNA as a carrier. The extraction was performed according to the manufacturer's instructions, except that the final wash (RPE buffer) was performed thrice instead of once. Total RNA was eluted with 50  $\mu\text{L}$  water.

For the cDNA synthesis, two pools with identical amounts of RNA from each subject were prepared: 8 and 5 samples for fracture and control groups, respectively. Then three independent cDNA syntheses for each pool (F1–F3 for the fracture group and C1–C3 for the control group) with Universal cDNA synthesis II kit (EXIQON) were performed. As an additional quality control, during cDNA synthesis, another two spike-ins (UniSP6 and cel-miR-39; EXIQON) were added to detect the presence of potential inhibitors in the cDNA synthesis process or in real-time PCR.

### Analysis of the Differential Expression of miRNAs

During the profiling stage, for the analysis of the expression of miRNAs by real-time PCR, the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Serum/Plasma Focus microRNA PCR Panel, and 384 wells (V3.M: EXIQON) were chosen. These panels contained primers for the detection of the 179 most expressed miRNAs in human serum (Supplementary Table S1; Online Resource 1). Moreover, they contained primers for the detection of the spike-ins added during the RNA extraction and cDNA synthesis which would indicate variability among plates and the presence of possible inhibitors in cDNA synthesis, and/or PCR. Each 384-well plate contained 2 complete panels of primers and 2 negative controls.

Real-time PCR was performed according to the manufacturer's instructions. In each 384-well plate, cDNAs from a BF and control sample were amplified in parallel. Expression values were calculated by the  $2^{-\Delta C_t}$  method [15], and in Tables, the mean and SD of the three technical replicates are shown. Moreover, the fold change showing the value of the change in expression between the control and BF groups was calculated.

During the validation stage, the calculations were performed identically except that the expression was determined in individual RNA samples (12 controls and 15 BF). For the analysis of expression of these miRNAs, real-time PCRs were performed with specific miRCURY LNA microRNA PCR primers (EXIQON). To normalize the expression of the miRNAs being validated, the GeNorm algorithm (EXIQON software) was used [16]. This made it possible to find optimal reference genes which had not changed their expression in the two experimental conditions. The results revealed two possible candidates, miR-140-3p and miR-93-5p. Since the miR-93-5p gene is a candidate for endogenous control in EXIQON arrays, it was decided to use this miRNA as a housekeeping.

### Statistical Analysis

A logarithmic transformation ( $\log_2$ ) was used to normalize the expression data in the profiling stage. False discovery rate (FDR) correction was used for multiple comparisons. To that end,  $Q$  values were calculated based on the  $P$  values of the same datasets as estimates of the multiple-testing-corrected FDR using the R package QVALUE software (version 3.1.1; <http://www.r-project.org/>). For the analysis of hierarchical clustering of genes and samples, the miRCURY LNA microRNA Array Analysis Software (EXIQON) was used. Euclidean distances and the average linkage method were selected, using the normalized expression values of each miRNA to represent clusters.

Tukey's test, included in the statistical package SPSS statistics for Windows (version 22, IBM Corp., Armonk, NY), was used for the detection of outliers in the validation stage. In order to normalize the distribution, winsorized raw data at  $\alpha = 0.05$  minimized the influence of outliers by replacing them with the next highest or lowest non-outlier value, depending on the tail of the distribution. Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) were used for comparisons of means between groups (SPSS). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to examine differences in microRNA levels among groups after adjustment for the confounder variable age (SPSS).

In the present work, a sample size of 11 controls and 14 fractured patients was estimated to be sufficient to get statistical power of 85 %. This was done assuming the mean and SD for miR-21-5p in both groups in order to detect a mean difference among them of 2.5 arbitrary gene expression units, which is lower than the detected mean (see Results). For the analysis, the online Epidat 3.1 software package (<http://www.sergas.es/>) was used.

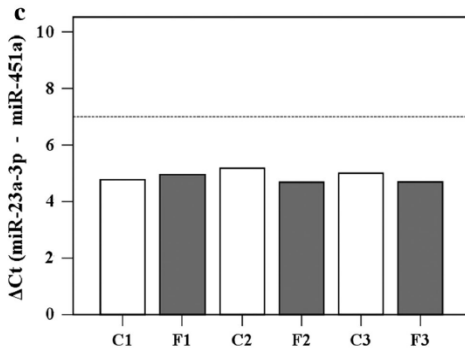
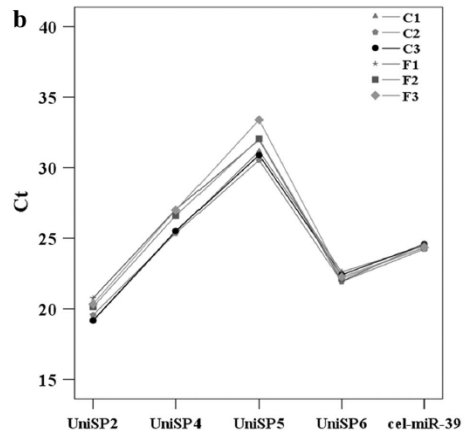
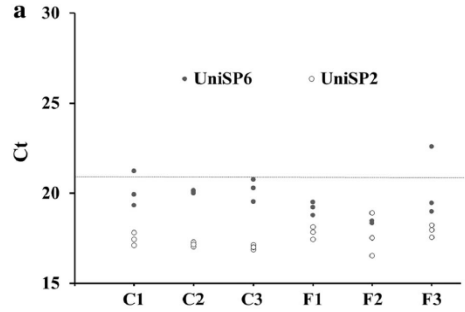
Values shown in the text, tables and figures are mean  $\pm$  SD, unless otherwise specified. All analyses are two-tailed, and significance is defined as  $P < 0.05$ , except when multiple comparisons are analyzed.

**Results**

**Quality Controls**

To determine the efficiency of RNA extractions and/or the presence of inhibitors in cDNA synthesis or in PCR, it was decided to quantify the levels of two spike-ins by real-time PCR, one added before RNA extraction (UniSP2) and the other during cDNA synthesis (UniSP6). The results showed that both spike-ins were at normal levels ( $C_t < 21$  cycles) in the 6 cDNAs (Fig. 1a). All cDNA synthesis passed this quality control.

Furthermore, both the spike-ins added during RNA extraction as well as those added during the synthesis of cDNA were in constant and known proportions. Therefore, if there was no presence of PCR inhibitors, the spike-ins should have been detected to decrease proportionally (UniSP2 > UniSP4 > UniSP5 and UniSP6 > cel-miR-39), as indeed they were (Fig. 1b). Statistical analysis confirmed the absence of outliers in the  $C_t$  values for the different spike-ins on all panels. Consequently, the presence of inhibitors was excluded, and all panels were included in the analysis.



**Fig. 1** Results of technical and quality controls of the samples in the profiling stage. **a** The  $C_t$  for controls UniSP6 and UniSP2 miRNAs (spike-ins) in each of the three performed cDNA synthesis from RNA pool controls (C1–C3) and fractured patients (F1–F3). Virtually all technical replicates are under the desirable  $C_t \leq 21$  threshold (horizontal line). **b** Determination of  $C_t$  for each of the spike-ins in the six reactions of cDNA synthesis. The  $C_t$  clearly represent the concentrations of each spike-in added according to the manufacturer's protocol (UniSP2 > UniSP4 > UniSP5 and UniSP6 > cel-miR-39). **c** Difference between  $C_t$  for miR-23a-3p and miR-451a in each cDNA synthesis reaction. The difference did not reach 7 (horizontal dotted line), set as indicative of hemolysis, in any of the cDNA synthesis reactions

Besides the oxyhemoglobin analysis made for each panel, there were two miRNAs (miR-23a, unaffected by hemolysis and miR-451, specific of erythrocyte) whose ratios determined the level of hemolysis. Indeed, hemolyzed samples show values  $>7$  for  $\Delta C_t$  (miR-23a-3p–miR-451a) [17], a circumstance that did not occur in our synthesis of cDNA (Fig. 1c).

#### Analysis of Differential Gene Expression: profiling stage

Table 1 shows the main characteristics of the women included in the pools at the profiling stage. The group of BF was older and showed lower height and worsening bone parameters, mainly at the hip site, than did women included in the control group.

A first analysis, determined the genes expressed in the RNA pools in each group by PCRs performed in triplicate. Those miRNAs with  $C_t$  values  $>37$  in two or more repetitions were considered not expressed. Thus, there were 9 genes not expressed out of the 179 tested (miR-95, miR-182-5p, miR-204-5p, miR-190a, miR-200c-3p, miR-20a-3p, miR-208a, miR-200a-3p, and miR-92-3p). The expression values for each miRNA were normalized to the mean expression value for each cDNA synthesis and were excluded from the study miRNAs with average values of  $C_t > 34$ , since these expression levels indicated great variability.

**Table 1** Anthropometric and bone characteristics of selected women included in the pools to analyze the profiling of miRNAs expression between femoral neck fracture (FRACTURE) and osteoarthritis (CONTROL) groups of women

	CONTROL ( $N = 5$ )	FRACTURE ( $N = 8$ )	$P$ value
Age (years)	63.4 $\pm$ 8.1	79.6 $\pm$ 3.1	0.0003
Weight (kg)	71.2 $\pm$ 11.7	62.6 $\pm$ 11.0	0.209
Height (cm)	164.2 $\pm$ 4.4	155.5 $\pm$ 5.1	0.009
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	26.4 $\pm$ 4.4	26.0 $\pm$ 4.9	0.866
FN-BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	0.961 $\pm$ 0.133	0.594 $\pm$ 0.094	0.0001
FN T-score	-0.140 $\pm$ 1.101	-3.225 $\pm$ 0.789	0.0001
FN Z-score	0.680 $\pm$ 1.152	-1.275 $\pm$ 0.573	0.002
LS-BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	1.165 $\pm$ 0.199	0.833 $\pm$ 0.181	0.020
LS T-score	-0.300 $\pm$ 1.625	-3.057 $\pm$ 1.527	0.020
LS Z-score	0.750 $\pm$ 1.484	-0.686 $\pm$ 1.370	0.139

The analysis detected 42 miRNAs (nominal  $P$  value) differentially expressed between groups (Table 2), although this number was reduced to 12 with significant  $P$  values after correcting with the Benjamini–Hochberg FDR test. Figure 2 shows the hierarchical clustering of the normalized expression values of the 12 miRNAs that passed the FDR test. Two populations of samples were clearly separated (Control vs. BF), as were two populations of miRNAs: miR-144-5p, miR-21-5p, miR-101-3p, miR-210, miR-122-5p, miR-423-5p, and miR-155-5p in BF group; miR-143-3p, miR-497-5p, miR-125b-5p, miR-365a-3p, and miR-409-3p in the control group (Table 2; Fig. 2).

#### Analysis of Differential Gene Expression: Validation Stage

The validation stage analyzed the expression of 5 genes that passed the FDR test (Table 2) and, after a literature search, could be related to bone metabolism (miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, and miR-21-5p) plus miR-34a-5p since this miRNA appears to be a novel and critical suppressor of bone resorption [18].

At this stage, miRNA expression was analyzed individually. During the analysis, three samples were excluded for not complying with the quality criteria ( $C_t < 21$ ) for the UniSP2 spike-in. Anthropometric, biochemical and bone characteristics of the analyzed women ( $N = 27$ ) at this stage are shown in Table 3. The BF group was older and showed worsening bone parameters, mainly at the hip site, as expected. In addition, this group also showed significantly higher levels of osteocalcin and CTx (Table 3).

In order to assess the diagnostic value of the six serum miRNAs at the validation stage, a ROC analysis was conducted. The results revealed that 3 of them (miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p) had AUCs values greater than 0.7 ( $P < 0.05$ ), especially miR-122-5p and miR-21-5p (both  $P < 0.0013$ ) (Fig. 3) indicating their value as biomarkers for distinguishing BF patients from osteoarthritic controls.

**Table 2** miRNA expression levels

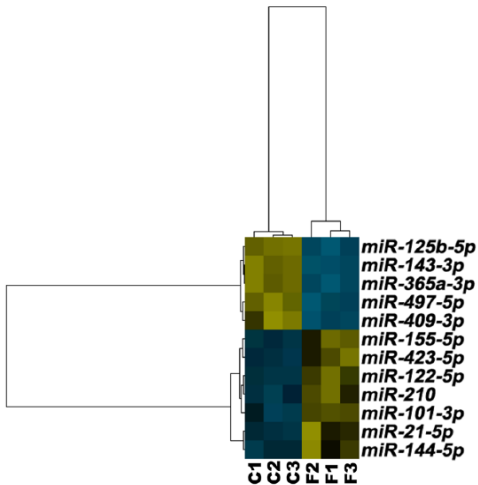
miRNA	CONTROLS	FRACTURE	Fold change	P value	Q value
miR-143-3p	1.37 ± 0.08	0.28 ± 0.02	4.92	0.000007	<b>0.001</b>
miR-122-5p	1.00 ± 0.12	5.50 ± 0.69	-5.48	0.00008	<b>0.006</b>
miR-497-5p	0.41 ± 0.02	0.20 ± 0.01	2.07	0.0001	<b>0.006</b>
miR-155-5p	0.006 ± 0.001	0.020 ± 0.001	-3.67	0.0001	<b>0.006</b>
miR-125b-5p	1.46 ± 0.09	0.32 ± 0.07	4.62	0.0003	<b>0.011</b>
miR-423-5p	1.52 ± 0.02	2.43 ± 0.18	-1.60	0.0004	<b>0.011</b>
miR-365a-3p	1.28 ± 0.10	0.22 ± 0.06	5.90	0.0005	<b>0.011</b>
miR-101-3p	1.69 ± 0.15	2.87 ± 0.03	-1.70	0.0005	<b>0.011</b>
miR-409-3p	0.04 ± 0.01	0.015 ± 0.001	2.97	0.0006	<b>0.011</b>
miR-210	0.18 ± 0.03	0.43 ± 0.05	-2.37	0.002	<b>0.026</b>
miR-21-5p	15.4 ± 0.30	24.2 ± 2.7	-1.57	0.002	<b>0.033</b>
miR-144-5p	0.14 ± 0.03	0.50 ± 0.11	-3.45	0.002	<b>0.033</b>
miR-26b-5p	0.37 ± 0.06	0.13 ± 0.03	2.80	0.004	>0.05
miR-151a-3p	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01	-1.37	0.004	>0.05
miR-551b-3p	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.01	4.12	0.006	>0.05
miR-18a-5p	0.44 ± 0.06	0.27 ± 0.03	1.67	0.007	>0.05
miR-195-5p	0.18 ± 0.05	0.02 ± 0.02	7.25	0.008	>0.05
miR-34a-5p	0.18 ± 0.02	0.03 ± 0.02	5.31	0.009	>0.05
miR-23b-3p	2.72 ± 0.26	2.06 ± 0.11	1.32	0.019	>0.05
miR-145-5p	0.83 ± 0.19	0.19 ± 0.09	4.44	0.013	>0.05
miR-338-3p	0.30 ± 0.02	0.49 ± 0.09	-1.64	0.014	>0.05
miR-29c-3p	2.41 ± 0.13	1.89 ± 0.17	1.27	0.015	>0.05
miR-133b	0.27 ± 0.10	0.04 ± 0.02	7.77	0.015	>0.05
miR-335-5p	0.19 ± 0.06	0.07 ± 0.02	2.87	0.015	>0.05
miR-133a	0.38 ± 0.11	0.06 ± 0.04	5.99	0.016	>0.05
miR-486-5p	9.32 ± 1.13	14.01 ± 1.80	-1.50	0.018	>0.05
miR-27b-3p	1.67 ± 0.25	1.10 ± 0.11	1.51	0.019	>0.05
miR-320b	1.00 ± 0.25	1.87 ± 0.18	-1.86	0.019	>0.05
miR-505-3p	0.07 ± 0.02	0.14 ± 0.02	-1.95	0.021	>0.05
miR-199a-3p	1.40 ± 0.26	0.72 ± 0.18	1.94	0.022	>0.05
let-7i-3p	0.029 ± 0.010	0.010 ± 0.001	2.79	0.025	>0.05
miR-193b-3p	0.38 ± 0.04	0.08 ± 0.05	4.96	0.025	>0.05
miR-132-3p	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.08	-2.51	0.030	>0.05
miR-296-5p	0.009 ± 0.001	0.017 ± 0.001	-1.85	0.030	>0.05
miR-22-3p	3.59 ± 0.44	4.93 ± 0.62	-1.37	0.032	>0.05
miR-10a-5p	0.009 ± 0.001	0.015 ± 0.001	-1.71	0.032	>0.05
miR-30e-3p	0.035 ± 0.001	0.018 ± 0.010	1.91	0.035	>0.05
miR-127-3p	0.014 ± 0.001	0.021 ± 0.001	-1.48	0.036	>0.05
miR-93-3p	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.01	-1.71	0.042	>0.05
miR-199a-5p	0.47 ± 0.04	0.24 ± 0.09	2.00	0.042	>0.05
let-7e-5p	0.11 ± 0.04	0.24 ± 0.07	-2.15	0.047	>0.05
miR-1	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	2.46	0.047	>0.05

Bold values indicate the miRNAs that passed the FDR test for multiple comparisons (Q values <0.05)

Values shown are those with a nominal P value <0.05 which was obtained using Student's t test paired with data normalized by log2 transformation. Q values were calculated as estimates of the multiple-testing false discovery rate (FDR)

The median relative expression levels (normalized to the mean of miR-93-5p) are shown in Fig. 4. Of the 6 miRNAs chosen for the validation stage, only 3 of them

(miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p) showed significant differences between groups. Note that miRNAs with higher diagnostic value, showed more



**Fig. 2** Hierarchical clustering of normalized expression values of the 12 miRNAs that passed the FDR test. To generate the dendrogram showing the hierarchy of groups and genes, EXIQON software was used, applying the Euclidean distance and average linkage method

significant  $P$  values, expressed mainly in the sera of BF patients.

None of the 3 differentially expressed miRNAs (miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p) were affected by hemolysis. This validation stage included hemolyzed sera (7 of 15 for BF patients and 5 of 12 for controls) to determine the effect of hemolysis. There were no significant differences between groups for levels of miRNA with the use of the hemolysis variable (yes/no) as the dependent variable in the ANOVA test (not shown), indicating that the levels of these three miRNAs were not affected by hemolysis.

An interesting finding is the strong correlation between the levels of miR-21-5p and CTx ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.00001$ ; Fig. 5). Since the levels of miR-21-5p correlated positively and significantly with levels of miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b, and miR-210-5p; these similarly showed positive correlations with CTx levels, although only were significant those of miR-122-5p ( $r = 0.59$ ,  $P = 0.002$ ), miR-125b-5p ( $r = 0.56$ ,  $P = 0.003$ ), and miR-210 ( $r = 0.50$ ,  $P = 0.009$ ) (not shown). Regarding other correlations, miR-125b-5p ( $r = 0.43$ ,  $P = 0.03$ ) and miR-21-5p ( $r = 0.51$ ,  $P = 0.008$ ) correlated positively with osteocalcin levels. MiR-125b-5p correlated with phosphate levels

**Table 3** Anthropometric, biochemical, and bone characteristics of selected women to validate data obtained with profiling between femoral neck fracture (FRACTURE) and osteoarthritis (CONTROL) groups of women

	CONTROL ( $N = 12$ )	FRACTURE ( $N = 15$ )	$P$ value
Age (years)	65.4 ± 10.5	81.0 ± 5.4	0.00004
Weight (kg)	70.2 ± 17.3	61.9 ± 13.6	0.218
Height (cm)	160.9 ± 5.9	157.3 ± 5.6	0.165
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.0 ± 6.0	24.9 ± 4.8	0.366
PTH (pg/mL)	59.8 ± 25.2	57.3 ± 28.1	0.818
25(OH)D3 (ng/mL)	13.4 ± 9.3	9.9 ± 6.1	0.256
CTx (ng/mL)	0.39 ± 0.11	0.78 ± 0.22	0.00002
OC (ng/mL)	12.3 ± 4.6	21.1 ± 6.2	0.001
Total-ALP (U/L)	176.8 ± 84.5	219.1 ± 110.0	0.283
Bone-ALP (μg/L)	7.8 ± 4.1	9.7 ± 3.6	0.236
Calcium (mg/dL)	8.5 ± 0.8	8.6 ± 0.4	0.692
Phosphate (mg/dL)	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.4	0.348
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.968 ± 0.115	0.602 ± 0.095	<0.000
FN T-score	-0.100 ± 0.957	-3.146 ± 0.813	<0.000
FN Z-score	0.667 ± 0.893	-1.192 ± 0.507	<0.000
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.168 ± 0.163	0.900 ± 0.172	0.007
LS T-score	-0.257 ± 1.351	-2.489 ± 1.458	0.007
LS Z-score	0.657 ± 1.205	-0.133 ± 1.208	0.215

*BMI* body mass index, *PTH* parathyroid hormone, *CTx* carboxy-terminal telopeptides of collagen I, *ALP* alkaline phosphatase, *25(OH)D3* 25-hydroxycholecalciferol, *OC* osteocalcin, *BMD* bone mineral density



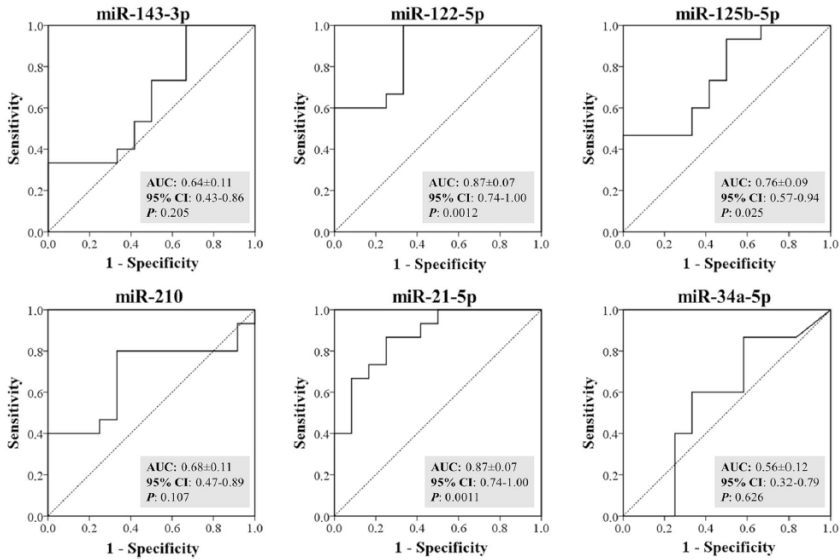


Fig. 3 Area under curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) for miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, miR-21-5p, and miR-34a-5p and ROC curves for each. AUCs, 95 % confidence intervals (95 % CI), and nominal *P* values are shown

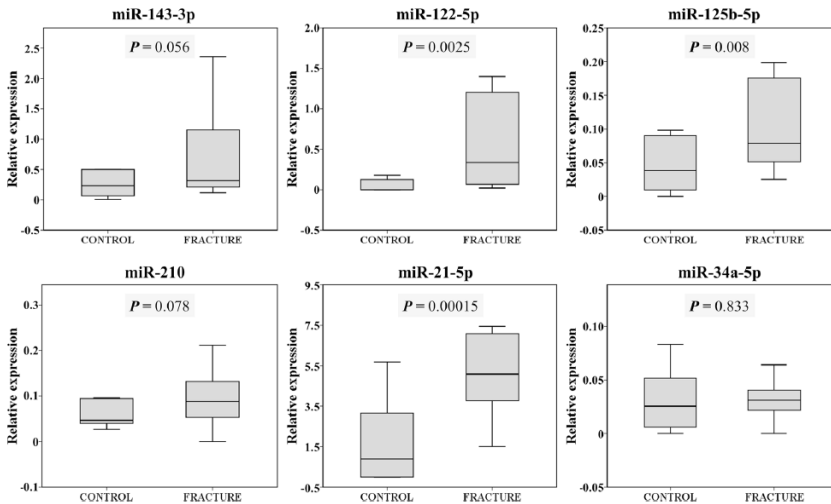
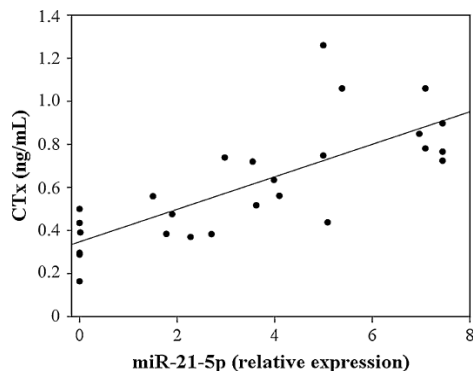


Fig. 4 Box plot showing interquartile range and median of expression levels for miR-143-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-210, miR-21-5p, and miR-34a-5p at the validation stage. The values represent the relative levels normalized to the levels of the control miRNA miR-93-5p



**Fig. 5** Regression line showing the correlation between the expression levels of miR-21-5p and CTx levels in all women at the validation stage. Expression values for miR-21-5p are relative levels normalized to the levels of the control miRNA miR-93-5p

( $r = 0.40$ ,  $P = 0.013$ ), while both miR-122-5p and miR-21-5p showed a trend ( $P < 0.08$ ) to correlate positively with levels of both Total-ALP and Bone-ALP, although only was significant the correlation of miR-122-5p with Total-ALP ( $P = 0.037$ ). Interestingly, miR-210 levels correlated positively with Bone-ALP levels ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.007$ ) (not shown).

Finally, given that age was significantly different between groups; an ANCOVA test adjusting for age was conducted (not shown). Only the difference for the miR-21-5p was significant (adjusted mean  $\pm$  SE for BF patients:  $5.20 \pm 0.64$  vs.  $1.69 \pm 0.75$  for controls;  $P = 0.005$ ), although a trend was observed for miR-125b-5p (adjusted mean  $\pm$  SE for BF patients:  $0.11 \pm 0.02$  vs.  $0.05 \pm 0.02$  for controls;  $P = 0.096$ ).

## Discussion

The present study has described miRNAs miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p as preferentially expressed in sera from women who have suffered a hip fracture due to fragility with respect to those from controls. These three miRNAs have shown in an ROC analysis that they were valuable biomarkers for distinguishing BF patients from controls, mainly miR-122-5p and miR-21-5p, and could eventually become markers for clinical use. Two of the highlights of this study are having used serum from patients to search for differentially expressed miRNAs, and for having patients who were undergoing hip prosthesis implantation due to severe osteoarthritis as controls, in order to maximize the matching of variables between groups.

This study was designed in an effort to find serum biomarkers to inform on the risk, progress, and the effect of treatment for various diseases, including bone disease. Indeed, BMD is the main predictor of fracture risk, but it is a slow technique, as it takes 1–2 years of monitoring in order to establish disease progression [12]. Biochemical markers of bone remodeling derived from enzymes or collagens [13] are available, but they unfortunately exhibit a high degree of variability, thus posing substantial limitations for their use in a clinical setting [19]. In this regard, miRNAs are becoming valid biomarkers in many pathologies, mainly as a result of their stability and ease of detection. This stability has been attributed to their encapsulation into microvesicles in serum or plasma [20]. Moreover, classical markers usually signal that there is an increase in final metabolite levels (e.g., CTx). However, miRNAs, because of their specificity, can indicate the cellular and molecular processes affected, which can lead to better therapeutic choices.

Another highlight of the present study is that miRNAs, preferentially detected in the sera of BF patients, were not affected by hemolysis. The use of hemolyzed sera was avoided during the profiling stage, but it was included at the validation stage to check its effect. This is important in clinical practice, where obtaining hemolyzed sera is not infrequent.

The results agree with those recently published by Seeliger et al. [21], although the study design was not the same. That group studied a population with hip BF whose members were subsequently classified as osteoporotic or not after DXA evaluation. It detected 9 miRNAs (miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b, and miR-148a) and 6 (miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100, and miR-125b miRNAs) that were significantly upregulated in the sera and bone tissue, respectively, of patients with osteoporosis. Note that the 3 miRNAs upregulated in the sera of the present study's BF patients appear in the list of 9 serum miRNAs (miR-122-5p, miR-125b-5p, and miR-21-5p). In fact, the sensitivity and specificity for these three miRNAs (Fig. 3) were very similar, even better, than those of the study of Seeliger et al. indicating that these three miRNAs can distinguish among patients with bone fracture those with osteoporosis [21], as well as the bone fracture patients from osteoarthritic controls (present study).

At this point, the behavior of miR-125b-5p should be mentioned. Levels of miR-125b-5p in the profiling stage are higher in controls (Table 2), while in the validation stage the levels are higher in BF patients (Fig. 4), in agreement with previous data [21]. This underlines the need to validate, in individual samples, the results of the profiling stage. In another study, Garmilla-Ezquerria et al. [22], describe a differential expression of 13 miRNAs

(nominal  $P < 0.05$ ) in primary osteoblasts from BF patients and osteoarthritic controls, as in the present study. Although they try to replicate the miR-210 (nominal  $P = 0.06$ ), because it seems to have been associated with osteoblast activity in human bone samples in a recent study [23], no statistical significance arises at the validation stage. This is similar to the present results ( $P = 0.078$ , Figs. 3, 4). In addition, the correlation detected in the present study, between levels of miR-210 and Bone-ALP ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.007$ ) suggests this possible osteoblastic function for this miRNA.

In contrast to the results of the present study and to those of Seeliger et al., there is a recently published paper in which miRNAs are analyzed in the plasma of Chinese postmenopausal women classified as normal, osteopenic, or osteoporotic. In this paper, Li et al. [24] detect three miRNAs differentially expressed in these groups of women (miR-21, miR-133a, and miR-146a), with the miR-21 levels highest in the control group.

Although the three studies cited have been conducted in different populations, and sample sizes are small, it is difficult to reconcile the results of Li et al. with those of Seeliger et al. and with those of the present work. This is because there is compelling evidence linking the miR-21-5p with an osteoclast function. In fact, Fig. 5, which shows the correlation between the levels of CTx and of miR-21-5p, reflects this involvement in osteoclastogenesis.

Indeed, miR-21-5p is one of the few miRNAs, together with miR-223 and miR-155, which is directly related to osteoclast differentiation [11]. This miRNA is identified in a study of mononuclear to multinuclear cells looking for RANKL-induced miRNAs upregulated during differentiation. Thus, RANKL induces miR-21-5p which down-regulates the PDCD4 protein level, which in turn removes repression from c-Fos, in a feed-forward mechanism in order to drive osteoclast differentiation, since c-Fos induces the expression of miR-21-5p [11]. Therefore, these studies suggest that miR-21-5p is a pro-osteoclastogenic miRNA, and interestingly, the up-regulation of miR-21 during osteoclastogenesis is antagonized by estrogens [25].

With respect to the other two miRNAs, miR-122-5p is associated with connective tissue disease and, interestingly, miR-125b-5p is involved in the regulation of osteoblastogenesis. Indeed, miR-125b, which is significantly upregulated in serum of BF patients, inhibits osteoblastogenesis by down-regulating cell proliferation. In addition, in ST2 mouse mesenchymal cells, the expression of miR-125b-5p is decreased after treating the cells with BMP-4. Moreover, miR-125b has a negative effect on osteoblastic differentiation because its over-expression decreases ALP activity [26].

The above notwithstanding, the present study has a number of limitations. Despite a modest sample size, we

have been able to detect differences in the expression of miR-21-5p between groups with a statistical power higher than 85 %. Moreover, given the normal profiles of women who suffer hip fracture fragility and which are subjected to a hip prosthesis implantation for severe osteoarthritis, our groups had significantly different ages. Despite this, the miR-21-5p has proven to be significantly different even after adjusting for age, thus further validating this miRNA.

In conclusion, if it is possible to detect signatures of circulating miRNAs in BF patients, unlike classical markers, these can report on the cellular and molecular processes involved. This will make it possible to select the most suitable drugs to stop or reverse the process. These miRNAs, however, also share similar sources of variability with classical markers. Therefore, both the standardization of the techniques, as well as their characterization in several independent studies is critical to reliable diagnoses and prognoses. The present paper describes three miRNAs that can become biomarkers of disease, especially miR-21-5p.

**Acknowledgments** The authors are indebted to Mrs. R. Aliaga and Dr. V. Ballester for their technical assistance in management of the patients and biochemical assays. Likewise, the authors are indebted to Drs. A. López Castel and JM Fernández-Costa, both from Valentia Biopharma (Valencia, Spain) for their excellent technical assistance regarding miRNA profiling and validation experiments. This work was supported by grant PI12/02582 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain), including funds from EU's FEDER Program. Layla Panach is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Programa de Formación del Profesorado Universitario).

#### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Human and Animal Rights and Informed Consent** The study was conducted according to the Helsinki Declaration of 2000 and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Institute of Health Research, INCLIVA. All participants in the study read and signed an informed consent according to the regulations of INCLIVA.

#### References

1. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY (2013) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 24:23–57
2. Kanis JA, Oden A, Johnell O, De Laet C, Jonsson B, Oglesby AK (2003) The components of excess mortality after hip fracture. *Bone* 32:468–473
3. Ralston SH, Uitterlinden AG (2010) Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 31:629–662
4. Hsu YH, Kiel DP (2012) Clinical review: genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1958–E1977

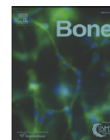
5. Guil S, Esteller M (2009) DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 41:87–95
6. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
7. He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522–531
8. Brookes E, Shi Y (2014) Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annu Rev Genet* 48:237–268
9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15524–15529
10. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101:2087–2092
11. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y (2012) MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 8:212–227
12. Gluer CC (1999) Monitoring skeletal changes by radiological techniques. *J Bone Miner Res* 14:1952–1962
13. Gamero P (2014) New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 66:46–55
14. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, Reid G (2011) Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 6:e24145
15. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36
16. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:0034.1–0034.11
17. Blondal T, Jensby NS, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang TM, Dahlsveen IK (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59:S1–S6
18. Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, Xie XJ, He L, Mangala LS, Lopez-Berestein G, Sood AK, Mendell JT, Wan Y (2014) miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgf $\beta$ 2. *Nature* 512:431–435
19. Seibel MJ (2005) Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 26:97–122
20. Cortez MA, Calin GA (2009) MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 9:703–711
21. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, van Griensven M (2014) Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 29:1718–1728
22. Garmilla-Ezquerro P, Sanudo C, Delgado-Calle J, Perez-Nunez MI, Sumillera M, Riancho JA (2015) Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 96:30–37
23. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y (2009) miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett* 583:2263–2268
24. Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J (2014) Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* 19:553–556
25. Sugatani T, Hruska KA (2013) Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *J Cell Biochem* 114:1217–1222
26. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y (2008) miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 368:267–272





Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bone](http://www.elsevier.com/locate/bone)

## The role of CD40 and CD40L in bone mineral density and in osteoporosis risk: A genetic and functional study

Layla Panach<sup>a</sup>, Begoña Pineda<sup>a</sup>, Damián Mifsut<sup>b</sup>, Juan J. Tarín<sup>c</sup>, Antonio Cano<sup>d</sup>, Miguel Ángel García-Pérez<sup>a,e,\*</sup><sup>a</sup> Research Foundation, Institute of Health Research INCLIVA, 46010 Valencia, Spain<sup>b</sup> Orthopedic Surgery and Traumatology, Clinic Hospital, Institute of Health Research INCLIVA, 46010 Valencia, Spain<sup>c</sup> Department of Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain<sup>d</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain<sup>e</sup> Department of Genetics, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 May 2015

Revised 2 October 2015

Accepted 2 November 2015

Available online xxxx

## Keywords:

Osteoporosis

CD40/CD40L genes

Association study

Functional genetics

Osteoimmunology

## ABSTRACT

Compelling data are revealing that the CD40/CD40L system is involved in bone metabolism. Furthermore, we have previously demonstrated that polymorphisms in both genes are associated with bone phenotypes. The aim of this study is to further characterize this association and to identify the causal functional mechanism.

We conducted an association study of BMD with 15 SNPs in *CD40/CD40L* genes in a population of 779 women. In addition, we assessed the functionality of this association through the study of the allele-dependent expression of *CD40* and *CD40L* in peripheral blood leukocytes (PBLs) and in human osteoblasts (OBs) obtained from bone explants by qPCR and by sequencing. When an allelic imbalance (AI) was detected, studies on allele-dependent *in vitro* transcription rate and on CpG methylation in the gene promoter were also performed.

Our results confirm the genetic association between SNP rs116535 (T > C) of *CD40L* gene with LS-BMD. Regarding *CD40* gene, two SNPs showed nominal *P*-values < 0.05 for FN- and LS-BMD (*Z*-scores), although the association was not significant after correcting for multiple testing. Homozygous TT women for SNP rs1883832 (C > T) of *CD40* gene showed a trend to have lower levels of OPG (*Q*-value = 0.059), especially when women of BMD-quartile ends were selected (*P* < 0.05). Regarding functionality, we detected an AI for rs1883832 with the C allele the most expressed in OBs and in PBLs. Since the rs116535 of *CD40L* gene did not show AI, it was not further analyzed. Finally, we described a differential methylation of CpGs in the *CD40* promoter among women of high in comparison to low BMD.

Our results suggest that the CD40/CD40L system plays a role in regulating BMD. Effectively, our data suggest that a decreased production of OPG could be the cause of the lower BMD observed in TT women for rs1883832 of the *CD40* gene and that the degree of methylation of CpGs in the *CD40* promoter could contribute to the acquisition of BMD. One possibility that deserves further study is whether the degree of methylation of the *CD40* gene affects the level of CD40 expression and, consequently, the level of OPG.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Osteoporosis is a systemic skeletal disease associated with low bone mass and the microarchitectural deterioration of the bone. It is a multifactorial disease resulting from complex interactions between genetic susceptibility and such environmental factors as physical activity, diet, use of certain drugs and smoking, among others [1,2].

Certainly, the greatest progress made in understanding the cellular and molecular basis of this condition was recognizing that it is influenced by interactions among three different systems, immune, hematopoietic and bone, constituting a new field of research: osteoimmunology [3].

\* Corresponding author at: Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Av. Menéndez Pelayo, 4 acceso, 46010 Valencia, Spain.

E-mail address: migarpe@uv.es (M.Á. García-Pérez).

Indeed, besides the spatial proximity within the cavity of the bone marrow (BM), the bone-forming cells (osteoblasts (OBs)), the bone resorbing cells (osteoclasts (OCs)) and the immune cells (mainly B- and T-cells, dendritic cells and monocytes), together with their respective precursors, share many regulatory cytokines, receptors, signaling molecules and transcription factors [1,4]. Perhaps the most significant molecules in this interaction are the receptor activator of the NF- $\kappa$ B (RANK), its ligand (RANKL), both of which were initially described in immune cells where they play a key role in cell survival and immunomodulation [5], and osteoprotegerin (OPG). In the bone, the binding of RANKL on stromal or osteoblastic cells to RANK on pre-osteoclasts, together with the macrophage colony stimulating factor (M-CSF), is necessary and sufficient for the generation, differentiation and activation of osteoclasts [6]. The OPG is a soluble decoy receptor of RANKL produced by OB/stromal cells, the main physiological inhibitor of osteoclastogenesis [7].

But besides these three key cytokines for bone homeostasis, whose deficiency is associated with extreme phenotypes [8], compelling data on the interaction between the immune, skeletal and hematopoietic systems has come to light. Bone loss is a constant in autoimmune and inflammatory diseases. The T-cell produces RANKL, and this molecule is responsible for the bone loss observed in periodontitis or adjuvant arthritis. The mouse deficient in T-cells does not lose bone mass after ovariectomy or with a continuous administration of PTH. Circulating monocytes can differentiate into functional osteoclasts. Mice deficient in B-cells are osteoporotic. B-cells are the main producers of OPG in the bone marrow and express RANKL. Cells related to OBs are critical regulators of the hematopoietic stem cell niche, from which all blood and immune cells derive. There are many other examples [4,9–11].

A pair of molecules important for both the immune system, as well as for the skeletal system is CD40L (also known as CD154) and its receptor CD40. The latter is expressed on antigen presenting cells, hematopoietic progenitor cells, and cells of OB lineage, whereas CD40L is transiently expressed on activated T-cells [12,13]. The CD40/CD40L system is crucial for many relevant immune system functions such as the differentiation and activation of macrophages, antibody isotype switching, and acquisition of immunological memory in B-cells. Regarding the bone, studies have shown osteoporosis and diminished BM OPG production in CD40 and CD40L KO mice [14]. Additionally, children affected by the hyper-IgM syndrome, a primary immunodeficiency which presents with recurrent infections and low levels of IgG, show osteopenia [15]. Moreover, mice lacking CD40L in T-cells are protected against bone loss induced by OVX or by continuous PTH administration [16,17].

The above amply justifies the interest in the CD40/CD40L system of association studies with bone phenotypes. However, these studies were largely unknown when we decided to study the association of SNP rs1883832 (C > T) of the *CD40* gene and BMD [18]. Among the reasons leading us to carry out this line of investigation was the relationship of CD40 with autoimmune and inflammatory pathologies [19], knowing that osteoporosis has a significant inflammatory component [20], and that rs1883832 was a functional variant affecting the translation rate of CD40 [19]. Subsequently, as CD40 interacts *in vivo* with CD40L, we extended the study to this gene. To do so, we jointly analyzed the association of rs1883832 and three SNPs of the *CD40L* gene, selected on the basis of its heterozygosity, its MAF, and its location in the two-haplotype blocks. In that study, we described an interaction between SNPs in the *CD40/CD40L* genes and low BMD [21].

All these genetic, biochemical, and association data have pointed to the CD40/CD40L system as an important regulator in bone homeostasis deserving further study. The present study had three objectives. The first was to continue the analysis of association with BMD through a gene-wide study by examining additional SNPs in order to further characterize the gene region associated with BMD. The next objective was to establish whether the associated SNP showed an allele-dependent differential gene expression (allelic imbalance, AI) in human primary OBs obtained from bone explants and in peripheral blood leukocytes (PBLs). Once an AI was detected, the third objective was to try to establish the cause of this AI through genetic and epigenetic approaches.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study subjects

The study group used for the genetic association studies (BMD-cohort) consisted of women of Spanish ancestry living in Valencia, in the east of Spain, who we have analyzed previously [18,21–24], and who were consecutively recruited into the study because they requested the services of the menopause unit of our hospital. This was the only criterion for inclusion into the study. Exclusion criteria were the following: those with a medical history of bone disease different from primary osteoporosis; those with hyperparathyroidism; those who used drugs

known to alter bone mass or bone metabolism different from hormone therapy (HT) before the densitometric study; those under 35 years of age.

Women were classified as postmenopausal, as peri-menopausal or as pre-menopausal, as previously described [22]. In the present study, we genotyped a total of 779 women, most of whom were postmenopausal ( $n = 685$ ) and the remaining were pre- or peri-menopausal (70% peri-menopausal). The women completed a questionnaire on risk for osteoporosis including menopausal status, weight and height, and the use of drugs that could potentially alter bone metabolism. The data were recorded. These data were completed and contrasted with our own data obtained from the medical records and data recorded in the regularly scheduled visits by the attending gynecologist.

In order to quantify the relative expression of CD40 in bone samples, we used primary OBs obtained from our cohort of bone fracture (Fracture-cohort), which was previously described [25]. Briefly, the sample was comprised of postmenopausal Caucasian women over 50 belonging to the area of our hospital that required the implantation of a hip prosthesis due to an osteoporotic subcapital hip fracture.

The Clinical Research Ethics Committee approved this study, and the women read and signed an informed consent according to the regulations of the Institute of Health Research INCLIVA.

### 2.2. Anthropometric, biochemical and bone density measurements

Women went to the hospital between 8:00–10:00 am after an overnight fast for basal blood sampling for biochemical determinations, for obtaining DNA, and for determining their BMI, calculated as the ratio between weight (kg) and height squared ( $m^2$ ).

Serum was separated and kept at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  until analysis. The levels of carboxy terminal telopeptides of collagen I (CTX) and 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D3) were measured by electrochemoluminescence (E170 Modular Analyser; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Levels of osteoprotegerin (OPG) were assayed by an instant-ELISA kit (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). The detection limits for OPG were 3.1  $\mu\text{g/mL}$ , while the reported intra- and interassay coefficients of variation were 7.0% and 8.0%, respectively. Levels of total alkaline phosphatase (ALP), intact parathyroid hormone (PTH), 17 $\beta$ -estradiol, and total calcium and phosphate were assayed as previously described [26].

Quantification of bone mineral density (BMD,  $\text{g/cm}^2$ ) was performed using dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the non-dominant proximal femoral neck (FN-BMD) and at the lumbar spine (L2–L4, LS-BMD) using a Norland XR-36 (Norland Medical Systems Inc.; Fort Atkinson, WI, USA) or a Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA) densitometer. To compare data from two different manufacturers, a standardized BMD (sBMD) was calculated according to a previous work [21].

### 2.3. Single nucleotide polymorphisms and genotyping

The collection of blood samples and the obtention of genomic DNA were performed as previously described [22]. We analyzed the databases of HapMap and dbSNP (National Center for Biotechnology Information) to find and select the SNPs to study. To do this, we analyzed the haplotype blocks in each region using the Haploview 4.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) and the Gabriel method [27]. The tag-SNPs were selected using the algorithms available in Haploview with the “aggressive tagging” option [27]. A minor allele frequency (MAF) in the HapMap-CEU population of 0.05 and an  $r^2$  of 0.8 were used as criteria. The possible functionality of selectable tag-SNPs was assessed using the GenePipe software, a web-based tool, to identify potentially functional SNPs in genes <http://genepipe.ncgm.sinica.edu.tw/>.

For the *CD40* gene (chromosome 20), the Haploview software detected two haplotype blocks; one in 5' and one in 3' of the gene. We selected four SNPs in the 5' block (rs1800686, rs752118, rs1883832, and

rs745307), three SNPs in the interblock region (rs4810485, rs11569317, and rs3746821), and two SNPs in the 3' block of the gene (rs11569333 and rs3765459). For the *CD40L* gene (X-chromosome), the analysis showed two haplotype blocks covering approximately from the 5' UTR region to intron 2 (block 1) and from here to the 3' UTR region (block 2). We selected five SNPs in block 1 (rs3092952, rs3092949, rs3092946, rs1126535 and rs5930973) and one SNP in block 2 (rs3092923). The genotyping of the SNPs by allelic discrimination using TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) and quality control was performed as previously described [22].

#### 2.4. RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) from human PBLs (BMD-cohort) and from primary OBs obtained from bone explants obtained from postmenopausal women during arthroplasty (Fracture-cohort), as previously described [28]. RNA integrity and concentration was determined as previously described [24]. One microgram of RNA was reverse transcribed in a 20- $\mu$ L reaction volume into single-stranded cDNA with a first-strand cDNA synthesis kit using an oligo-dT primer (ThermoScript reverse transcription [RT]-polymerase chain reaction [PCR] system; Invitrogen). For each RT, a blank was prepared using all the reagents except the RNA sample which was then used as a non-template control in real-time PCR experiments. After RT, gene expression was determined, in triplicate, by real-time PCR on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) as described [26]. Data were recorded and analyzed with the 7900 HT software (version 2.2.2), and the gene expression underwent relative quantification [29].

#### 2.5. Differential allelic expression

An imbalanced allelic expression is detected when the allelic ratio of heterozygous in the RNA (cDNA) differs from the corresponding 1:1 ratio in genomic DNA [30]. We were interested in studying a possible allelic imbalance (AI) for the synonymous SNP rs1126535 (T > C) of the *CD40L* gene and for SNP rs1883832 (C > T) located at the 5'-UTR of the *CD40* gene. This interest is justified because our group previously detected an association with BMD for both SNPs [21], because of the association results of the present study (see Results), but especially because the two SNPs are transcribed to mature RNA, a necessary condition for AI studies [30].

To do so, we obtained genomic DNA (gDNA) and total RNA from the PBLs of 18 heterozygous women for both SNPs (BMD-cohort), in basal conditions, i.e. without treatment. RNA integrity was assayed, and 0.15  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed in a 20- $\mu$ L reaction volume into single-stranded cDNA as described previously [26].

To amplify the SNP rs1126535 (chromosome position: 136,648,396) from gDNA and cDNA, we used the same forward primer (5'-ACCAAATCTCCCGATCT-3') and specific reverse primers for gDNA (5'-CCATCATCCATCATTTGGGTA-3') and for cDNA (5'-CTTTTAATCTCTCAGCAGT CAGTAA-3'), generating fragments of 225 and 250 bp, respectively. Similarly, to amplify the SNP rs1883832 (chromosome position 46,118,343) from gDNA and cDNA, we used the same forward primer 5'-CGAGGGGATCAGCAGAG-3' and specific reverse primers for gDNA (5'-TGTGCGACTCACCAGTTT-3') and for cDNA (5'-GGCACAAGAAGCAAGCACTGA-3'), generating fragments of 217 and 189 bp, respectively. The amplicons were sequenced using the same primers as previously described [23].

The sequence traces were analyzed using PeakPicker (<http://genomequebec.mcgill.ca/EST-HapMap>), normalizing heterozygote ratios based on peak intensities of neighboring bases [31]. The AI is defined using the sample specific test, which considered that there was AI if  $\sim$ 80% of heterozygous individuals showed overexpression of the high expressed allele as determined by consistent deviation in independent cDNA samples beyond the 95% confidence interval obtained from gDNA samples [31].

#### 2.6. Reporter constructs and gene-reporter assays

A main objective of this study was to establish whether SNPs located in the *CD40* gene promoter region affected gene expression *in vitro* using gene-reporter assays. In the present study we analyzed the SNPs rs1800686 (G/A; chromosome position: 46,117,764; at -580 nt of ATG position) and rs752118 (C/T; 46,118,099; at -245 nt of ATG position). We did not include the SNP rs1883832 in 5'UTR (C/T; 46,118,343), because it had been described previously and did not affect the rate of gene transcription [19].

To perform the analysis, from gDNA obtained from genotyped women of BMD-cohort, we amplified, a region of 463 bp between positions 46,117,689 and 46,118,152 (according to the GRCh38 genome assembly) using the primers forward 5'-aaaaaagagctcGGATGGATGGAAATGAGGTG-3' and reverse 5'-aaaaaactcagTAATCCCCGGGAGTTAG-3', designed by Primer-3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Target sequences (underlined) for restriction endonucleases *SacI* (5'-GAGCTC-3') and *XhoI* (5'-CTCGAG-3'), respectively, and a polyA tail to aid digestion were added to the primers.

The SNPs rs1800686 (G/A) and rs752118 (C/T) are in strong linkage disequilibrium so we only detected two possible haplotypes (G-C and A-T, respectively). After amplification of both haplotypes, amplicons were digested with *SacI* and *XhoI* enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA) and ligated into the pGL3-promoter vector (Promega) by using T4 Ligase (Roche). *Escherichia coli* cells were transformed by heat shock with constructs or with empty control vectors, grown in liquid medium. The plasmids obtained were purified by QIAGEN Plasmid Plus Maxi kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). All constructs were verified by sequencing.

For the luciferase activity assays, Saos-2 cells, a human primary osteogenic sarcoma cell line, were plated in 6-well plates and cultured until 80% confluence in McCoy's medium (Invitrogen) with 10% FCS and antibiotics (complete medium). Then, 3.8  $\mu$ g of reporter constructs or control plasmids and 0.2  $\mu$ g of normalizing luciferase of *Renilla reniformis* pRLSV40 expression vector (Invitrogen) in McCoy's medium without FCS or antibiotics were cotransfected using 10  $\mu$ L of LipofectA-MINE F2000 (Invitrogen) for 5 h. Next, cells were washed with PBS, incubated in complete medium during 48 h, and luciferase activity was assayed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega) with an X4 Victor Multilabel Plate Reader luminometer (PerkinElmer, Waltham, MA). The luciferase activity of pGL3 vectors was normalized against luciferase activity of the pRLSV40 vector, as described by the manufacturer.

#### 2.7. Quantitative assessment of DNA-methylation

One aim of this study was to establish whether among women with high and low BMD (BMD-cohort) there were differences regarding the degree of methylation of CpG islands located around the transcription start site (TSS). To do this, we select two groups of women with high and low BMD (both, N = 30), obtained as average values of FN and LS-BMD. All of them were postmenopausal women without treatment.

For CpG island identification, we used the web-tool CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) [32], analyzing more than 2000 bp around the TSS of the *CD40* gene. Sequenom's MassARRAY platform was used to perform quantitative methylation analysis. This system utilizes MALDI-TOF mass spectrometry in combination with RNA base-specific cleavage (MassCLEAVE) [33].

Isolated genomic DNA (1  $\mu$ g) from PBLs was treated with sodium bisulphite for 16 h using the EZ-96 DNA-methylation kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Of possible amplicons designed for the *CD40* gene by Epidesigner software (Sequenom), we selected two covering 40% of CpG island 1 and the entirety of CpG island 2. The primers used for amplicon 1 (310 bp) were the following: 5'-GAAATTTTGGATGGGAAATTTTT-3' and 5'-TCCCAAAAACAACCTCTTCTTTTA-3', and for amplicon 2 (432 bp): 5'-GATTTGGGGTAAAGAAGAAGAGT-3' and



5'-ACAAAATCAACAAAAAACCTCT-3'. Each forward primer contained a 10-nucleotide tag to adjust for  $T_m$  differences, and each reverse primer contained a T7 promoter tag for *in vitro* transcription. The amplification protocol was: 95 °C for 15 min (1 cycle), and 95 °C for 20 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s (45 cycles). Unincorporated dNTPs were dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase (Sequenom).

For the MassCLEAVE process, 2  $\mu$ L of PCR products were subjected to *in vitro* transcription and RNA cleavage with T7 R&DNA polymerase and RNaseA (both from Sequenom). Subsequently, the samples were spotted onto a 384-pad Spectro-CHIP with the use of a MassARRAY nanodispenser (Sequenom), and spectra were acquired with a MassARRAY compact matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Sequenom). Methylation was analyzed with EpiTyper software (Sequenom) to generate quantitative results for each CpG site. Methylation data were generated as values between 0 and 1, indicating percentage methylation of the original template. For each sample, the methylation analysis was done in triplicate and CpG sites showing more than 15% difference in methylation were excluded.

### 2.8. Statistical analysis

To test the homogeneity of the study group and the genotyping quality, the genotype frequencies for each SNP were tested against the proportions of Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) using the SNPStats software (<http://bioinfo.iconcolgia.net/index.php?module=Snpstats>) [34]. This software was also used to conduct a haplotype study with all the SNPs of each gene with respect to LS- and FN-BMD (Z-scores). Moreover, we previously had demonstrated using the Structure software, that our population had no stratification or substructures with a probability higher than 0.996 [23]. The model of inheritance (co-dominant, dominant, overdominant and recessive), and a previous ANOVA test asking for BMD (Z-scores) according to the model of inheritance was also performed with SNPStats.

Data regarding methylation were analyzed individually for each CpG site, except in the cases where CpG sites occurred very close together. In those cases, two or even three CpG sites were analyzed jointly (CpG1-9.10, CpG2-4.5, CpG2-8.9, CpG2-12.13.14). The  $\beta$  value delivered by the software (0–1) indicated the percentage of methylation of the original template.

The multiple test threshold for significance for each gene was estimated by considering the effective number of independent marker loci, using the Li and Ji approach, as implemented in the single nucleotide spectral decomposition (SNPsd) web tool [35], which takes into consideration the linkage disequilibrium between loci. The estimated number of independent tests was 11 instead of 15, resulting in a multiple test-adjusted significance threshold of 0.005.

False discovery rate (FDR) correction was used for multiple comparisons in methylation, bone and biochemical data. To that end, Q-values were calculated based on the P-values of the same data sets as estimates of the multiple testing corrected FDR by using QVALUE [36] software at the R package (version 3.1.1; <http://www.r-project.org/>).

Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) and covariance (ANCOVA) were used for comparisons of means between groups. ANCOVA was used for comparing bone and biochemical variables among genotypes and for comparing methylation data among high/low BMD groups. Biochemical, bone, and methylation variables were adjusted for the covariates age, weight, and height. The other covariates, i.e., postmenopausal status, surgical menopause and HT-user were entered into the statistical models as fixed factors because of their dichotomous nature.

In the present work, we estimated the sample size of 686 as sufficient to obtain a statistical power of 85%. This was done in order to detect a gene effect of  $R^2 = 0.013$  (estimated by regression analysis between LS Z-score BMD and rs1126535 SNP) according to a mean  $\pm$  SD for Z-score BMD of  $-0.17 \pm 1.26$  for the entire population and a

frequency for the C allele of 0.16 under a dominant model of inheritance. For the analysis, we used the QUANTO software package (<http://hydra.usc.edu/GxE/>) [37].

Values shown in the text, tables and figures are means  $\pm$  SD and frequencies, unless otherwise specified. All analyses were two-tailed, and significance was defined as  $P < 0.05$ , except when multiple comparisons were analyzed. Except when indicated, all data was analyzed with the use of IBM SPSS statistics for Windows (version 22.0; Armonk, NY: IBM Corp.).

## 3. Results

### 3.1. Genetic association with bone phenotypes

The features of the women studied are shown in Table 1. The characteristics and location of the polymorphisms studied, nine of them of the CD40 gene and six of the CD40L gene, are shown in Supplemental Table S1. Our population had no substructures as described previously [23]. Allele frequencies were similar to those described in the HapMap database for Europeans. Note that the observed genotype frequencies for all SNPs were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (uncorrected P-value  $> 0.05$ ). Of the 15 SNPs studied, the software GenePipe only assigned a risk prediction for SNP rs1126535 (medium risk), since the variation could affect the regulation of splicing (Supplemental Table S1).

Figs. 1 and 2 show the haplotype structure and nominal P-values of the association of the CD40 and CD40L SNPs, respectively, with FN- and LS-BMD (Z-scores) according to a model of recessive inheritance for CD40 and dominant for CD40L, estimated as the best models by the SNPStats software. Although two SNPs (rs1883832 and rs4810485) showed nominal P-values  $< 0.05$  for FN- and LS-BMD (Z-scores), none was significantly associated with BMD after adjustment for multiple-test ( $P < 0.005$ ) (Fig. 1). Regarding the CD40L gene (Fig. 2) several SNPs had nominal P-values  $< 0.05$  but only one remained significantly associated to LS-BMD (Z-score) after multiple-test adjustment (rs1126535;  $P = 0.0017$ ). The haplotype analysis confirmed the results, but it did not increase the strength of association (not shown). It revealed only that the haplotype of CD40L gene formed by G–G–T–T–G–C alleles (according to the order of SNPs shown in Supplemental Table S1) and with a frequency of 2.2% imposed a negative difference in the LS-BMD Z-score of  $-0.79$  (95% CI:  $-1.26$  to  $-0.36$ ;  $P = 0.0003$ ) compared to that for the more common haplotype A–G–T–T–G–T.

Table 2 shows the epidemiological features of the cohort under the model of inheritance for the SNPs rs1883832 (recessive) and rs1126535 (dominant). There were no differences between genotypes for the analyzed variables.

**Table 1**  
Anthropometric and bone characteristics of the Spanish cohort of women studied (mean  $\pm$  SD or percentage).

	Number	Values
Age (year)	779	52.7 $\pm$ 6.4
Years since menopause (year)	779	6.2 $\pm$ 5.9
Weight (kg)	779	66.1 $\pm$ 11.0
Height (cm)	779	157.7 $\pm$ 6.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	779	26.6 $\pm$ 4.3
Postmenopausal status (%)	685	88.0
Surgical menopause (%)	206	26.4
HT user (%)	218	28.0
OPG (pg/mL)	510	101.7 $\pm$ 37.1
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	748	0.808 $\pm$ 0.121
FN T-score	748	$-0.856 \pm 1.05$
FN Z-score	748	$-0.06 \pm 0.99$
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	752	1.008 $\pm$ 0.154
LS T-score	752	$-1.03 \pm 1.42$
LS Z-score	752	$-0.17 \pm 1.26$

BMI, body mass index; HT, hormone therapy; OPG, osteoprotegerin; BMD, bone mineral density; FN, femoral neck; LS, lumbar spine.



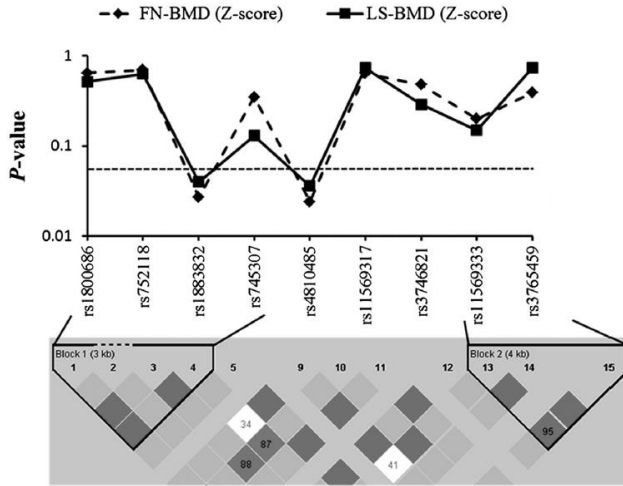


Fig. 1. Association (nominal  $P$ -values) of *CD40* polymorphisms with FN- and LS-BMD (Z-scores) in our cohort under a recessive model of inheritance. The dashed line represents the conventional unadjusted threshold for statistical significance ( $P = 0.05$ ). In the lower part, the haplotype structure, and the location of each SNP in each block, is shown. BMD, bone mineral density.

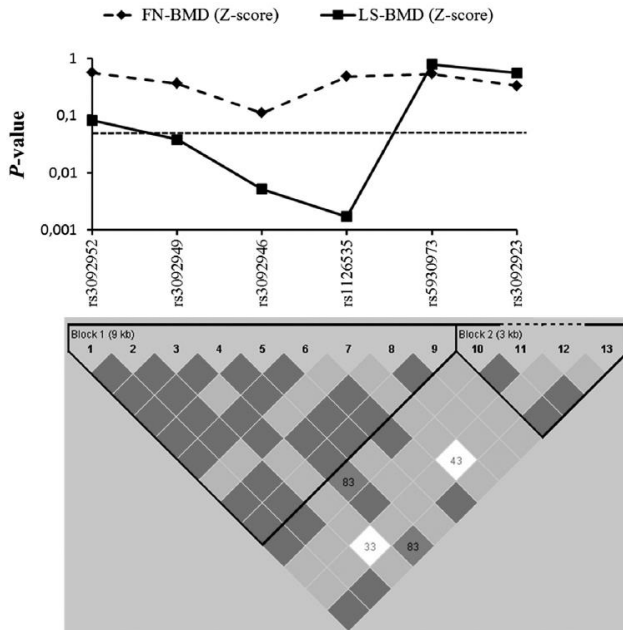


Fig. 2. Association (nominal  $P$ -values) of *CD40L* polymorphisms with FN- and LS-BMD (Z-scores) in our cohort under a dominant model of inheritance. The dashed line represents the conventional unadjusted threshold for statistical significance ( $P = 0.05$ ). In the lower part, the haplotype structure, and the location of each SNP in each block is shown. BMD, bone mineral density.

Table 3 shows the biochemical and bone characteristics adjusted for the covariates age, weight, height, postmenopausal status, surgical menopause and HT-user. For SNP rs1883832 of the CD40 gene, the CC/CT women showed higher values for bone parameters ( $P < 0.05$ ) than TT women, although differences were not significant after applying the FDR test ( $Q$ -values  $> 0.05$ ). However, one interesting outcome was that of the OPG levels, since women of the TT genotype showed a clear trend to have lower levels of OPG (adjusted  $P = 0.0049$ ;  $Q = 0.059$ ; Table 3). By selecting women with OPG values ( $N = 510$ ) and quartile ends for FN Z-score or for LS Z-score, OPG levels were significantly higher in the group of high bone mass for both locations (Table 4). When analyzing the distribution of genotypes for rs1883832 (CD40), women with the TT genotype were distributed into the group of low BMD and low OPG levels, as opposed to women with the CC/CT genotype, with a resulting distribution significantly different for both bone locations (FN and LS).

For the SNP rs1126535 of the CD40L gene, women with the CC/CT genotype showed higher values for bone parameters in the lumbar spine than did TT women. They remained significant even after applying the FDR test.

### 3.2. Differential allelic expression results

In order to detect whether a differential allelic expression was the cause of the association of these SNPs to BMD, identified in the present and in our previous studies [18,21], we analyzed CD40 and CD40L gene expression regarding genotype by real time qPCR, both in primary OBs as well as from PBLs (Fig. 3). For SNP rs1883832 of the CD40 gene, the expression in OBs was higher in CC women than it was in CT women when GAPDH expression was used as housekeeping ( $P = 0.03$ ). In addition, it showed this trend when the expression was related to  $\beta$ -ACTIN ( $P = 0.10$ ). Furthermore, PBL CD40 expression was lower in CT/TT women with respect to that for CC women, both in GAPDH ( $P = 0.03$ ) and  $\beta$ -ACTIN ( $P = 0.04$ ) housekeeping gene expression.

The expression of CD40L was not detected in OBs (not shown), while in PBLs, the CT genotype for SNP rs1126535 (CD40L) expression increased more than that for the TT genotype when the expression was compared relative to GAPDH ( $P = 0.039$ ), although not with  $\beta$ -ACTIN (Fig. 3).

Given that the results were inconclusive and there was a low availability of homozygous genotypes for both SNPs (TT for rs1883832 and CC for rs1126535), it was decided to study a potential AI in heterozygous, by sequencing [31] (see Material and methods). Supplemental Fig. S1 shows representative electropherograms for the analysis of AI for the C/T alleles of SNPs rs1883832 and rs1126535 of the CD40 and CD40L genes, respectively. As shown, the C allele (ancestral) was represented more than the T allele for SNP rs1883832 of the CD40 gene was (Supplemental Fig. S1, Panel A). We estimated this AI using the sample-specific test (AI95) which estimated that there was AI if  $>80\%$  of the cDNA samples were outside the 95% confidence interval, calculated from gDNA samples heterozygous for independent samples [31].

For the SNP rs1126535 of the CD40L gene, there was no AI detected when comparing the electropherograms between cDNA and gDNA

(Supplemental Fig. S1, Panel B). Consequently, this SNP was not explored further.

### 3.3. In vitro transcription levels in gene-reporter assays

Given the differential CD40 gene expression between CC women vs. CT women (OBs) or CT/TT women (PBLs), we studied whether the SNPs rs1800686 (G/A) and rs752118 (C/T), located at 5' of the CD40 gene affected the *in vitro* transcription rate. To this end, we cloned in the pGL3-promoter vector for the common haplotypes (G-C or A-T) of SNPs rs1800686 and rs752118, respectively (see Material and methods) and transfected such constructs and controls in Saos2 cells.

The results are shown in Supplemental Fig. S2. Luciferase expression from all transfected vectors referred to the pGL3-basic vector, which showed a basal transcription because it lacked an active promoter, while those of the empty pGL3-Promoter vector represented the rate when there was an active promoter. The constructs containing both haplotypes (G-C or A-T) in the pGL3-promoter vector showed twice the rate of transcription of the empty pGL3-promoter. These results agreed with there being a cloned fragment that had a cis element that increased the transcription rate of the luciferase gene, although there were no differences found between the two haplotypes regarding luciferase activity. These results were identical when we transfected HeLa cells with the same constructs (not shown).

### 3.4. DNA-methylation analysis of the CD40 promoter in women of high BMD vs. low BMD

Given the existence of a differential allele-dependent gene expression for the CD40 gene, unexplained by *trans*-acting elements, we decided to study *cis*-acting elements, such as a possible epigenetic regulation. To this end, we looked for CpG islands and our software detected CpG islands around the TSS in the CD40 gene (not shown). Our initial intention was to compare the degree of methylation in these CpG islands between TT and CC/CT women for SNP rs1883832 of the CD40 gene. However, given the lack of TT women, we tried to analyze the degree of methylation in these CpG islands among women with high and low BMD, since TT genotype was associated with a lower BMD and CC/CT with a higher BMD in our previous work [18,21].

In the CD40 gene, there are two CpG islands (CpG1 and CpG2), and in this study we quantified the degree of methylation of the CpGs in two overlapping amplicons, covering the entire CpG2 island and 40% of the CpG1 island (Supplemental Fig. S3). The anthropometric, biochemical, surgical menopause, and bone features of the 60 women selected are shown in Table 5. As expected, the group of women with higher BMD also showed higher body weight, although there were no significant differences in age, height, BMI, or percentage of surgical menopause. Although the number of TT women was the same, in the high BMD group there were more women with the CC genotype.

Table 6 shows the quantitation of DNA methylation of the CpG sites for the two amplicons analyzed. Amplicon 1 contained 12 CpGs while amplicon 2 contained 22. Some of the CpGs, however, were not detected by the system. Others, because of their proximity to one another, appeared as doublets or triplets. Consequently, only 20 CpGs appear in

**Table 2**  
Epidemiological characteristics of the study population cohort according to the rs1883832 (CD40) and rs1126535 (CD40L) genotypes.

	N	rs1883832 (CD40)		P-value	rs1126535 (CD40L)		P-value
		TT (N = 68)	CC/CT (N = 711)		TT (N = 538)	CC/CT (N = 230)	
Age (y)	779	53.9 ± 6.2	52.6 ± 6.4	0.122	52.6 ± 6.04	53.2 ± 7.0	0.229
Weight (kg)	779	67.0 ± 10.3	66.1 ± 11.1	0.524	66.3 ± 10.5	66.0 ± 12.1	0.604
Height (cm)	779	158.6 ± 6.8	157.6 ± 6.2	0.199	157.6 ± 6.3	157.5 ± 6.1	0.878
Postmenopausal status (%)	779	92.0	87.6	0.295	88.1	88.2	0.961
Surgical menopause (%)	779	29.7	24.9	0.375	24.0	27.0	0.336
HT-user (%)	779	23.5	27.3	0.505	26.7	27.4	0.836

HT, hormone therapy.

**Table 3**

Biochemical and bone characteristics of the study population cohort according to the rs1883832 (CD40) and rs1126535 (CD40L) genotypes. Values are estimated marginal means ± SE.

	N	rs1883832 (CD40)		P-value	Q-value	rs1126535 (CD40L)		P-value	Q-value
		TT (N = 68)	CC/CT (N = 71)			TT (N = 538)	CC/CT (N = 230)		
Estradiol (pg/mL)	709	38.1 ± 4.7	29.0 ± 2.3	0.042	0.084	23.7 ± 1.7	27.0 ± 2.3	0.164	0.394
PTH (pg/mL)	348	42.9 ± 2.6	46.4 ± 0.9	0.198	0.264	45.9 ± 1.1	46.4 ± 1.6	0.767	0.824
Ctx (ng/mL)	560	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.144	0.216	0.42 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.824	0.824
Calcium (mg/dL)	711	9.7 ± 0.1	9.6 ± 0.0	0.286	0.343	9.6 ± 0.0	9.6 ± 0.0	0.113	0.369
Phosphate (mg/dL)	710	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.0	0.085	0.146	3.6 ± 0.0	3.7 ± 0.0	0.123	0.369
Total ALP (U/L)	619	172.9 ± 5.8	167.4 ± 1.9	0.359	0.392	168.0 ± 2.4	171.6 ± 3.4	0.367	0.549
25(OH)D3 (ng/mL)	335	25.4 ± 3.2	27.1 ± 0.8	0.605	0.605	26.8 ± 0.7	25.5 ± 1.0	0.298	0.511
OPG (pg/mL)	510	89.3 ± 4.8	103.7 ± 1.8	0.0049	0.059	103.2 ± 2.0	99.1 ± 3.1	0.260	0.511
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	744	0.779 ± 0.015	0.811 ± 0.004	0.032	0.084	0.818 ± 0.007	0.823 ± 0.009	0.586	0.703
FN Z-score	744	-0.304 ± 0.127	-0.029 ± 0.038	0.039	0.084	-0.072 ± 0.044	-0.005 ± 0.069	0.412	0.549
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	749	0.959 ± 0.029	1.034 ± 0.008	0.012	0.071	1.018 ± 0.009	1.054 ± 0.011	0.0021	0.013
LS Z-score	749	-0.531 ± 0.242	0.052 ± 0.068	0.020	0.080	-0.083 ± 0.072	0.243 ± 0.096	0.0011	0.013

PTH, parathyroid hormone; Ctx, carboxyterminal telopeptides of collagen I; ALP, alkaline phosphatase; 25(OH)D3, 25-hydroxycholecalciferol; OPG, osteoprotegerin; FN, femoral neck; LS, lumbar spine; BMD, bone mineral density.

**Table 6.** Multivariate models adjusted by the covariates age, weight, height and surgical menopause, confirmed that 8 out of the 20 CpGs analyzed (40%) showed significant differences in DNA methylation values between women of high vs. low BMD (Adjusted P-value). When accounting for the FDR test in the multivariate model, only 7 out of 20 (35%) remained significant (adjusted Q-values). It is of interest that the main trend was for the CpG sites to be more methylated in women with low BMD (Table 6).

Finally, Supplemental Fig. S4 shows the heat map of the methylation values for CpG sites that were significantly different between women with high and low BMD, after correction by FDR. The majority (24 of 30) of women with high BMD were grouped on the left half of the image, showing different methylation profiles in the CD40 gene promoter between both groups of women.

**4. Discussion**

Increasingly, there is new evidence regarding the role of the CD40/CD40L system in regulating bone homeostasis. Indeed, osteoporosis and diminished BM OPG production in CD40 and CD40L KO mice [14], children affected by hyper-IgM syndrome caused by mutations in the CD40L gene showing osteopenia [15], and mice lacking CD40L that are protected against bone loss induced by continuous PTH administration or by OVX have been described [16,17].

In a previous study, we describe an interaction between the CD40 and CD40L genes regarding bone phenotype BMD and the risk of osteoporosis/osteopenia [21]. Overall, the results of the present study reinforce such genetic observations by demonstrating this association between LS-BMD and CD40L in a larger number of women by performing densitometric studies and by analyzing a large number of SNPs. Although two SNPs of CD40 gene showed an association with LS- and FN-BMD

(nominal P-value < 0.05), such an association was not significant after correcting for multiple testing because of the higher number of SNPs under study. This paper analyzes 779 women with DXAs, while in the previous study there were 719 for LS-BMD and somewhat fewer for FN-BMD, with a similar percentage of postmenopausal women. The rationale for increasing the number of SNPs over the previous study was to further characterize, in both genes, the genomic region associated with BMD, by using a gene-wide approach.

A remarkable result of the present study is the strong trend (adjusted P = 0.0049; Q-value = 0.059) in women homozygous for the T allele of SNP rs1883832 to have lower levels of OPG (Table 3). This relationship between the TT genotype and OPG levels is interesting for several reasons. We have previously described a lower BMD for homozygous women with the T allele [18,21]. Moreover, it has been described that individuals homozygous for the T allele have a 39.4% decreased expression of CD40 on the surface of their B-cells [19], and CD40 costimulation-promoted OPG production by bone marrow B-cells *in vivo* [14]. Therefore, overall, these data suggest that a decreased production of OPG in bone marrow could be a cause of the decreased bone mass in TT homozygous women (rs1883832) in this study and in our previous work [21]. The results in Table 4 support this possibility. Indeed, when we analyze women with OPG data, those of the quartile ends regarding BMD, women with the TT genotype were significantly distributed in the group with the lowest levels of BMD and OPG.

In this study, we were interested principally in characterizing the possible functionality of the different SNPs associated with BMD. To do this, initially we sought a possible allele-dependent differential gene expression in the SNPs most strongly associated with BMD, by real time qPCR and by sequencing [31]. The rate of gene expression by qPCR, both in OBs, as well as in PBLs, revealed that homozygous women for the C allele of SNP rs1883832 showed an increased expression of the CD40 gene in relation to other genotypes (CT in OBs and CT/TT in PBLs; Fig. 3). In regards to the CD40L gene, we detected no expression in the OBs, and the PBLs data were inconclusive.

Since one of our limitations was the lack of homozygous genotypes for both SNPs (TT for rs1883832 and CC for rs1126535), we decided to analyze a possible AI by sequencing a SNP transcript in each gene (see Material and methods) in a group of heterozygous women (CT) for both SNPs [31]. A significant AI favorable to the C allele, as opposed to the T allele, for rs1883832 was detected, since the C/T ratio was beyond the highest range for a CI of 95% estimated in gDNA from heterozygous samples in 87.5% of the samples. These data were similar to those of the qPCR for the same SNP and are in agreement with the highest expression of the CD40 protein in B-cells in individuals homozygous for the C allele [19], but differ from those published at the transcriptional level, since Jacobson et al. did not detect changes in gene transcription among alleles. Recently new data have been published

**Table 4**

Stratification of women with OPG values (N = 510) in relation to BMD. High and Low represent end quartiles for FN Z-score and for LS Z-score. Values are mean ± SD or counts. P-values were obtained from ANOVA test or from Chi-square (2 × 2) test (for distribution of genotypes in High/Low bone mass).

	Bone mass		P-value
	High (N = 127)	Low (N = 128)	
FN Z-score	1.348 ± 0.669	-1.128 ± 0.431	<0.000
OPG (pg/mL)	107.3 ± 37.3	96.0 ± 34.6	0.013
rs1883832 (CD40)			
TT/CC + CT	9/118	22/106	0.020
LS Z-score	0.915 ± 0.972	-0.644 ± 0.745	<0.000
OPG (pg/mL)	105.6 ± 37.7	96.1 ± 35.8	0.041
rs1883832 (CD40)			
TT/CC + CT	10/118	26/101	0.004

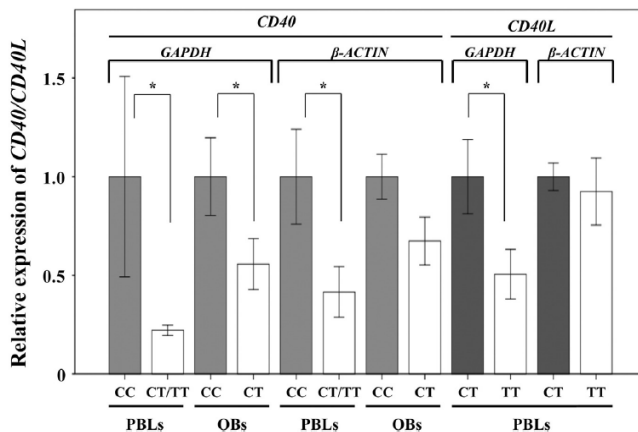


Fig. 3. *CD40* and *CD40L* expression (mean  $\pm$  SD) in primary OBs and in PBLs regarding genotype of SNP rs1883832 (*CD40*) and rs1126535 (*CD40L*). Gene expression was calculated using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  where  $\Delta C_t$  is the difference between the *CD40* or *CD40L* Ct and the Ct of the housekeeping gene (*GAPDH* or  $\beta$ -*ACTIN*). Values were normalized for the gene expression of the CC (*CD40*) or CT (*CD40L*) subjects. The sample size for *CD40* was CC = 8 and CT = 10 for primary OBs and CC = 5 and CT/TT = 10 for PBLs. The sample size for *CD40L* (PBLs) was CT = 10 and TT = 11. \* $P < 0.05$ .

that support our findings and show a lower transcription of the *CD40* gene in CT/TT individuals [38].

For the *CD40L* gene, we did not detect any bias for the allelic expression of C/T for the synonymous SNP rs1126535 by this technique. Consequently, this SNP was not further analyzed.

In order to explain the AI for *CD40*, we looked for potential transacting regulatory elements by analyzing the rate of *in vitro* transcription using reporter genes after cloning two haplotypes (G–C or A–T) of the 5' region of the *CD40* gene, belonging to the SNPs rs1800686 (G/A) and rs752118 (C/T) (Supplemental Table S1). The absence of differences between the two haplotypes with respect to the rate of transcription, suggests that genetic variants at the 5' region of *CD40* cannot explain the AI detected in this gene. Such *in vitro* studies, however, may represent artifacts different from what happens *in vivo*, since only certain fragments of potential regulatory regions are cloned. Furthermore, as they are PCR-amplified fragments, the DNA loses its methylation profile.

Since one of the possible causes of AI can be the epigenetic marks differentially deposited into chromatin in an allele-dependent manner [30], we decided to study the degree of methylation of the CpG islands around the TSS in the *CD40* gene. In this paper, we detected 8 differentially methylated CpGs out of a total of 20 (7 out of 20 when accounting for multiple testing) among women with high and low BMD. The norm was that women with the lower BMD had higher methylation in 6 out of

8 CpGs (Table 6 and Supplemental Fig. S4). Since DNA methylation is associated with lower rates of gene transcription [39], the differential methylation between these two groups of women could explain a higher or lower transcription of the *CD40* gene and, consequently, higher or lower levels, respectively, of OPG. This is a possibility that requires further study because it has been described that the activation of *CD40* with anti-*CD40* mAb or with the recombinant *CD40L* protein induces the production of OPG [14]. Finding that may support this hypothesis is that TT women ( $N = 6$ ) of rs1883832, which tend to have lower BMD and lower OPG levels (Tables 3 and 4) and have lower expression of *CD40* [19], showed higher rates of methylation in the 8 significant CpGs (Table 6) than did CC women ( $N = 23$ ). Given the low  $N$ , however, the differences were not significant (not shown).

Moreover, it is possible that the different degree of CpG methylation affects the rate of gene transcription because cytosine methylation may directly affect the affinity of transcription factors (TFs) toward their binding sites (TFBSs) [40]. Furthermore, it has been experimentally determined that TFBSs usually show low levels of DNA methylation and that, as a general rule, the binding of TF to its TFBS often occurs in the absence of methylation [41,42]. In fact, there are several examples where this has been demonstrated. For example, methylation of the E-box prevents n-Myc binding to promoters of *EGFR* and *CASP8* genes, and methylation of the YY1 binding site in the *Peg3* gene promoter represses the binding of YY1 [43,44]. We used the PATCH software (<http://www.gene-regulation.com/>) to search for TFBS in the sequence contained in our two overlapping amplicons (Supplemental Fig. S3). The software detected TFBSs in our differentially methylated CpGs for chromatin insulator protein CTCF (CpG 1–6, sequence: GCTGC), for Sp1 TF (CpG 2–4.5, sequence: CCGCG), for transcription repressor GCF (CpG 2–4.5, sequence: CTCCTGCGC), and for STAT1 TF (CpG 2–22, sequence: TTCCCGAA). Although it is impossible to draw conclusions on this without performing additional experiments, CTCF and GCF molecules are important regulators of gene expression, and both Sp1 and STAT1 TFs have been previously linked to the regulation of the *CD40* gene [45,46]. Accordingly, this differential methylation between women of high and low BMD may have functional consequences on the expression of *CD40*.

Our study has some limitations. It included only Caucasian women so it is not clear whether the results can be extrapolated to other ethnic

Table 5  
Anthropometric and bone characteristics of selected women with high and low BMD for methylation experiments (mean  $\pm$  SD).

	High BMD ( $N = 30$ )	Low BMD ( $N = 30$ )	<i>P</i> -value
Age (y)	52 $\pm$ 4.4	53.3 $\pm$ 3.9	0.239
Weight (kg)	69.0 $\pm$ 10.3	63.9 $\pm$ 8.1	0.038
Height (cm)	158.9 $\pm$ 6.9	156.0 $\pm$ 4.3	0.060
Surgical menopause (%)	20.0	23.3	1.000
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.4 $\pm$ 3.9	26.3 $\pm$ 3.5	0.255
OPG (pg/mL)	102.4 $\pm$ 28.8	91.9 $\pm$ 24.3	0.273
rs1883832 genotype (TT–CT–CC)	3–11–16	3–20–7	0.047
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.949 $\pm$ 0.111	0.690 $\pm$ 0.054	<0.000
FN Z-score	1.145 $\pm$ 0.986	–1.005 $\pm$ 0.468	<0.000
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.178 $\pm$ 0.100	0.805 $\pm$ 0.049	<0.000
LS Z-score	1.327 $\pm$ 0.982	–1.642 $\pm$ 0.380	<0.000



Table 6

Peripheral blood DNA methylation values (in %; estimated marginal means ± SE) for the CpG sites analyzed in the CD40 promoter in women of High vs. Low BMD.

CpG site <sup>a</sup>	Position (bp) <sup>b</sup>	High BMD (N = 30)	Low BMD (N = 30)	P-value <sup>c</sup>	Q-value <sup>d</sup>	Adjusted P-values <sup>e</sup>	Adjusted Q-values <sup>f</sup>
CpG 1-1	-523	4.8 ± 0.6	6.0 ± 0.6	0.156	0.224	0.189	0.270
CpG 1-4	-449	1.7 ± 0.4	2.8 ± 0.4	0.049	0.141	0.042	0.105
CpG 1-5	-432	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.4	0.781	0.781	0.777	0.812
CpG 1-6	-405	45.1 ± 2.4	33.9 ± 2.4	0.00045	0.0018	0.0013	0.0043
CpG 1-7	-398	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3	0.671	0.706	0.734	0.812
CpG 1-8	-378	3.8 ± 0.3	4.6 ± 0.3	0.079	0.172	0.092	0.165
CpG 1-9,10	-332	10.4 ± 0.9	9.5 ± 0.9	0.289	0.361	0.541	0.636
CpG 2-1	-232	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.114	0.193	0.076	0.162
CpG 2-2	-216	1.0 ± 0.3	4.9 ± 0.3	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
CpG 2-3	-202	4.6 ± 0.5	4.2 ± 0.5	0.452	0.532	0.514	0.636
CpG 2-4,5	-160	61.5 ± 2.9	86.9 ± 2.9	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
CpG 2-8,9	-118	5.2 ± 0.7	6.7 ± 0.7	0.125	0.193	0.151	0.232
CpG 2-12,13,14	-43	5.8 ± 0.5	6.7 ± 0.5	0.258	0.344	0.258	0.344
CpG 2-15	-19	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.4	0.617	0.686	0.812	0.812
CpG 2-16	-4	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.2	0.065	0.162	0.011	0.031
CpG 2-17	+7	6.3 ± 0.4	4.2 ± 0.4	0.006	0.019	0.0008	0.0030
CpG 2-19	+48	4.1 ± 0.5	2.9 ± 0.5	0.086	0.172	0.099	0.165
CpG 2-20	+69	1.1 ± 0.4	3.2 ± 0.4	0.00019	0.001	0.0004	0.0021
CpG 2-21	+77	58.5 ± 1.9	63.2 ± 1.9	0.125	0.193	0.081	0.162
CpG 2-22	+122	21.3 ± 2.1	32.9 ± 2.1	0.00016	0.001	0.0003	0.0021

<sup>a</sup> CpG1- and CpG2- denote CpG sites in amplicons 1 and 2, respectively (see (Supplementary material, Fig. S3). The numbers indicate the number of each CpG site. In general, values of a single CpG site are shown, but occasionally values of nearby 2 and even 3 CpG sites that the system could not resolve, are shown.

<sup>b</sup> CpG location site has been determined according to the ATG position for the CD40 gene (NCBI Reference Sequence: NG\_007279.1).

<sup>c</sup> P-values were calculated using an ANOVA test.

<sup>d</sup> Q-values were calculated as estimates of the multiple-testing false discovery rate (FDR).

<sup>e</sup> Adjusted P-values were calculated in an ANCOVA test to control for the covariates age, weight, height, and fixed factor surgical menopause.

<sup>f</sup> Adjusted Q-values were calculated as estimates of FDR on the adjusted P-values.

groups or even to men. Furthermore, the design of the study was clinical and volunteer based, not population based, and the sample size was medium, albeit with adequate power. Similarly, we have not provided data on dietary habits and physical activity. The present study, a priori, lacks clinical relevance as do most genetic association studies. We believe, nevertheless, that it reinforces the importance of the CD40/CD40L system in the regulation of bone homeostasis. Finally, other limitations of the study were the lack of determined genotypes for both SNPs and that we have focused on transcriptional processes and have not studied the effect of SNPs in relation to protein translation. To avoid false positives in our association study, we analyzed a population of a particular geographic region, having discarded substructures and women of other ancestry, and we have used covariates in the statistical analysis and a multiple test-corrected threshold for statistical significance to diminish the error type I risk related to the multiple SNPs/CpGs/variables analyzed. Therefore, although we tried to avoid potential biases, some may remain.

5. Conclusions

To conclude, our results suggest that the CD40/CD40L system plays a role in regulating BMD. We confirm the association of SNPs in the CD40L gene with BMD. We could not replicate this for the CD40 gene due to the imposition of the correction for multiple comparisons with the increased number of SNPs studied. Homozygous TT women for SNP rs1883832 (CD40), for which we previously described lower BMD [18,21], had lower levels of OPG. Furthermore, a differential methylation of CpGs around SNP rs1883832 was detected among women of high and low BMD, with the women with lower BMD having the more methylated CpGs. Whether the degree of methylation of the CD40 gene affects the level of CD40 expression and, consequently, the level of OPG deserves further study.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.002>.

Disclosures

All authors state that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are indebted to Mrs. R. Aliaga for her excellent technical assistance. This work was supported by grants PI09/O184 and PI12/O2582 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain), including funds from the EU FEDER Program.

Layla Panach is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Programa de Formación del Profesorado Universitario).

References

- S.H. Ralston, A.G. Uitterlinden, Genetics of osteoporosis, *Endocr. Rev.* 31 (2010) 629–662.
- J.A. Kanis, E.V. McCloskey, H. Johansson, C. Cooper, R. Rizzoli, J.Y. Reginster, European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women, *Osteoporos. Int.* 24 (2013) 23–57.
- J.R. Arron, Y. Choi, Bone versus immune system, *Nature* 408 (2000) 535–536.
- J. Lorenzo, M. Horowitz, Y. Choi, Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 403–440.
- D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature* 390 (1997) 175–179.
- D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89 (1997) 309–319.
- A. Leibbrandt, J.M. Penninger, RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143 (2008) 123–150.
- R. Pacifici, Osteoimmunology and its implications for transplantation, *Am. J. Transplant.* 13 (2013) 2245–2254.
- M.C. Horowitz, J.A. Fretz, J.A. Lorenzo, How B cells influence bone biology in health and disease, *Bone* 47 (2010) 472–479.
- R. Pacifici, Role of T cells in ovariectomy induced bone loss—revisited, *J. Bone Miner. Res.* 27 (2012) 231–239.
- R. Elgueta, M.J. Benson, V.C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, R.J. Noelle, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 152–172.
- S.S. Ahuja, S. Zhao, T. Bellido, L.I. Plotkin, F. Jimenez, L.F. Bonewald, CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4, *Endocrinology* 144 (2003) 1761–1769.

- [14] Y. Li, G. Toraldo, A. Li, X. Yang, H. Zhang, W.P. Qian, et al., B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo, *Blood* 109 (2007) 3839–3848.
- [15] E. Lopez-Granados, S.T. Temmerman, L. Wu, J.C. Reynolds, D. Follmann, S. Liu, et al., Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5056–5061.
- [16] J.Y. Li, H. Tawfeek, B. Bedi, X. Yang, J. Adams, K.Y. Gao, et al., Ovariectomy disrupts osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 768–773.
- [17] Y. Gao, X. Wu, M. Terauchi, J.Y. Li, F. Grassi, S. Galley, et al., T cells potentiate PTH-induced cortical bone loss through CD40L signaling, *Cell Metab.* 8 (2008) 132–145.
- [18] B. Pineda, P. Laporta, C. Hermenegildo, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, A C > T polymorphism located at position – 1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women, *Osteoporos. Int.* 19 (2008) 1147–1152.
- [19] E.M. Jacobson, E. Concepcion, T. Oashi, Y. Tomer, A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology, *Endocrinology* 146 (2005) 2684–2691.
- [20] M.N. Weitzmann, R. Pacifici, Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1186–1194.
- [21] B. Pineda, J.J. Tarin, C. Hermenegildo, P. Laporta, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, Gene-gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women, *Osteoporos. Int.* 22 (2011) 1451–1458.
- [22] L. Panach, D. Mifsut, J.J. Tarin, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women, *J. Bone Miner. Metab.* 32 (2014) 691–698.
- [23] B. Pineda, C. Hermenegildo, P. Laporta, J.J. Tarin, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women, *J. Bone Miner. Metab.* 28 (2010) 696–705.
- [24] B. Pineda, E. Serna, A. Laguna-Fernandez, I. Noguera, L. Panach, C. Hermenegildo, et al., Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: a functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women, *Bone* 65 (2014) 33–41.
- [25] L. Panach, D. Mifsut, J.J. Tarin, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, Serum circulating microRNAs as biomarkers of osteoporotic fracture, *Calcif. Tissue Int.* 97 (2015) 495–505.
- [26] B. Pineda, C. Hermenegildo, J.J. Tarin, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, Effects of administration of hormone therapy or raloxifene on the immune system and on biochemical markers of bone remodeling, *Menopause* 19 (2012) 319–327.
- [27] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 21 (2005) 263–265.
- [28] J. Delgado-Calle, C. Sanudo, A.F. Fernandez, R. Garcia-Renedo, M.F. Fraga, J.A. Riancho, Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone, *Epigenetics* 7 (2012) 83–91.
- [29] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002), e36.
- [30] T. Pastinen, T.J. Hudson, Cis-acting regulatory variation in the human genome, *Science* 306 (2004) 647–650.
- [31] B. Ge, S. Gurd, T. Gaudin, C. Dore, P. Lepage, E. Harmsen, et al., Survey of allelic expression using EST mining, *Genome Res.* 15 (2005) 1584–1591.
- [32] D. Takai, P.A. Jones, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 3740–3745.
- [33] M. Ehrlich, M.R. Nelson, P. Stanssens, M. Zabeau, T. Liloglou, G. Xinarianos, et al., Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 15785–15790.
- [34] X. Sole, E. Guino, J. Valls, R. Iniesta, V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies, *Bioinformatics* 22 (2006) 1928–1929.
- [35] D.R. Nyholt, A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 765–769.
- [36] J.D. Storey, R. Tibshirani, Statistical significance for genomewide studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9440–9445.
- [37] W.J. Gauderman, Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction, *Am. J. Epidemiol.* 155 (2002) 478–484.
- [38] M. Wagner, M. Sobczynski, M. Bilinska, A. Pokryszko-Dragan, M. Cyrul, P. Kusnierczyk, et al., MS risk allele rs1883832T is associated with decreased mRNA expression of CD40, *J. Mol. Neurosci.* 56 (2015) 540–545.
- [39] A.P. Feinberg, Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease, *Nature* 447 (2007) 433–440.
- [40] P.H. Tate, A.P. Bird, Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 (1993) 226–231.
- [41] R. Straussman, D. Nejman, D. Roberts, I. Steinfeld, B. Blum, N. Benvenisty, et al., Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 564–571.
- [42] R.E. Thurman, E. Rynes, R. Humbert, J. Vierstra, M.T. Maurano, E. Haugen, et al., The accessible chromatin landscape of the human genome, *Nature* 489 (2012) 75–82.
- [43] J. Kim, A. Kollhoff, A. Bergmann, L. Stubbs, Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, *Peg3*, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 233–245.
- [44] G. Perini, D. Diolaiti, A. Porro, V.G. Della, In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 12117–12122.
- [45] V.T. Nguyen, E.N. Benveniste, Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23674–23684.
- [46] M. Tone, Y. Tone, J.M. Babik, C.Y. Lin, H. Waldmann, The role of Sp1 and NF-kappa B in regulating CD40 gene expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8890–8897.

# A translational approach from an animal model identifies *CD80* as a candidate gene for the study of bone phenotypes in postmenopausal women

L. Panach<sup>1</sup> · E. Serna<sup>1</sup> · J. J. Tarín<sup>2</sup> · A. Cano<sup>3</sup> · M. Á. García-Pérez<sup>1,4</sup>

Received: 19 January 2017 / Accepted: 17 April 2017

© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2017

## Abstract

**Summary** This study represented a translational study that first compared gene expression of B cells of BM from ovariectomized and control mice, and then analyzed some of the differentially expressed genes in women. Results showed novel genetic associations with bone phenotypes and points to the *CD80* gene as relevant in postmenopausal bone loss.

**Introduction** Osteoporosis is a multifactorial disease with a strong genetic component. However, to date, research into osteoporosis has only been able to explain a small part of its heritability. Moreover, several components of the immune system are involved in the regulation of bone metabolism. Among them, B cells occupy a prominent place.

**Methods** The study consisted of two stages. In the first, gene expression in bone marrow B cells is compared between ovariectomized and SHAM control mice using microarrays. In the second, we studied the association of polymorphisms in some differentially expressed genes (DEG) in a cohort of postmenopausal women.

**Results** The present study has found 2791 DEG (false discovery rate (FDR) <5%), of which 1569 genes were upregulated (56.2%) and 1122 genes (43.8%) were downregulated. Among the most altered pathways were inflammation, interleukin signaling, B cell activation, TGF-beta signaling, oxidative stress response, and Wnt-signaling. Sixteen DEG were validated by MALDI-TOF mass spectrometry or qPCR. The translational stage of the study genotyped nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) of DEG or related and detected association with bone mineral density (BMD) (nominal *P* values), while adjusting for confounders, for SNPs in the *CD80*, *CD86*, and *HDAC5* genes. In the logistic regression analysis adjusted for confounders, in addition to the SNPs in the aforementioned genes, the SNPs in the *MMP9* and *SOX4* genes were associated with an increased risk of osteoporosis. Finally, two SNPs (in the *CD80* and *SOX6* genes) were associated with an increased risk of bone fragility fracture (FF). However, after Bonferroni correction for multiple testing, only the association between *CD80* with BMD and risk of osteoporosis remained significant.

**Conclusion** These results show that the use of animal models is an appropriate method for identifying genes associated with human bone phenotypes.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00198-017-4061-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. Á. García-Pérez  
migarpe@uv.es

<sup>1</sup> Research Unit — Institute of Health Research INCLIVA, Av. Menéndez Pelayo, 4 acceso, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Department of Cellular Biology, Functional Biology and Physical Anthropology, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Genetics, University of Valencia, Burjassot, Spain

**Keywords** Association studies · B cells · Osteoporosis · Ovariectomy · Translational research

## Introduction

The increase in lifespan is raising the incidence of degenerative diseases, including osteoporosis. Osteoporosis is a common skeletal age-related pathology associated with low bone mass and a deterioration in the bone micro-architecture leading to an increased risk of bone fragility

fracture (FF) [1]. Although it is a primarily feminine pathology, about a third of all FF occur in men. In women, this is because there is a bone loss associated with estrogen depletion occurring at menopause. But there is also a bone loss common to both sexes associated with the hyperparathyroidism related to age, with a resistance to vitamin D, and with decreasing antioxidant capacity—in short, to aging [2].

Osteoporosis is a multifactorial disease resulting from largely unknown, complex interactions including genetic susceptibility variants, epigenetic mechanisms, and environmental factors [1, 3]. Despite the numerous studies of candidate genes and dozens of genome-wide association studies (GWAS), there are only a few dozen genes significantly associated with bone phenotypes (mainly bone mineral density (BMD) and FF). This explains only a very small part of the total phenotypic variance (heritability) of these phenotypes [3–5]. To look for this missing heritability, research has delved into the study of rare and structural variants, phenomena such as epistasis or gene-environment interactions, and epigenetic mechanisms [6, 7].

The term osteoimmunology was coined to illustrate the functional interaction between the immune system, the hemopoietic system, and bone [8]. This interaction should not be a strange one since both systems share the same cellular niche, the bone marrow (BM). Moreover, it is long known that there is a relationship between inflammatory and autoimmune diseases and osteoporosis [9], which leads to the suspicion that immune cells could be involved in the bone turnover control. Much research has focused on the role of B cells, and largely of T cells. Thus, activated T cells promote bone loss in inflammatory diseases, in bone metastasis, and in postmenopausal osteoporosis [9, 10], either through direct interactions with BM-stromal cells and osteoblasts or by the release of pro-resorptive cytokines RANKL and TNF [10, 11]. In contrast, resting T cells may contribute to reduce *in vivo* bone resorption or stimulate bone formation through the secretion of Wnt-ligands [12, 13]. Regarding the role of B cells, the research states that these cells express RANKL, they are responsible for 64% of the BM anti-osteoclastogenic factor osteoprotegerin, and that mice deficient in B cells are osteopenic [13, 14].

A previous work with a translational perspective analyzed the global gene expression in an animal model of accelerated bone loss: the mouse subjected to OVX [15]. This study detected almost 200 genes whose expression in total BM was significantly different between OVX mice and SHAM control mice belonging to 23 significant regulatory networks, of which the top five canonical pathways included B cell development, primary immunodeficiency signaling, PI3K signaling in B cells, phospholipase C signaling, and FcγRIIB signaling in B cells. Given these results, suggesting a role for B cells in bone loss due to estrogen deficiency, we designed the present study. Its aim was to analyze the global gene expression in B

cells obtained from BM of OVX mice and compare it with that of SHAM mice with the intent to detect differentially expressed genes (DEG), then translate these results to a cohort of postmenopausal women.

## Materials and methods

### Mice and treatments

Thirteen-week-old female C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed in an environmentally controlled laboratory and acclimatized for 10 days. Then, the animals were either dorsal ovariectomized (OVX,  $N = 8$ ) or sham operated (SHAM,  $N = 6$ ) using 0.1 mg/kg buprenorphine as pre-anesthetic, 5% isoflurane to induce anesthesia, and 1.5% isoflurane as maintenance.

Four weeks after surgery, the mice were sacrificed by cardiac puncture exsanguination under anesthesia, and the blood, the uterus, and the femora were aseptically removed. The uterus was weighed to confirm the OVX surgery success. The BM cells were isolated from the femora of mice using centrifugation in 100  $\mu$ l DMEM, suspended with an additional 400  $\mu$ l DMEM, and counted for ulterior experiments [16, 17].

### Positive selection of CD19<sup>+</sup> B cells and flow cytometry

CD19<sup>+</sup> B cells were isolated using the EasySep magnetic bead separation system (Stem Cell Technologies SARL, Grenoble, France), according to the manufacturer's instructions. Briefly, total BM cells were resuspended in EasySep medium ( $1 \times 10^8$  cell/ml) and then, CD19 PE labeling reagent (50  $\mu$ l/ml) was added and incubated at RT for 15 min. Then, 100  $\mu$ l/ml of EasySep PE selection cocktail was added and incubated similarly. Subsequently, a 50  $\mu$ l/ml suspension of magnetic nanoparticles were added and incubated for 10 min. After incubation, the suspension was adjusted to 2.5 ml, resuspended gently, and deposited on a magnet for 5 min. After incubation, the negative fraction not retained by the magnet was collected with 2.5 ml of medium (four times), and then purified CD19<sup>+</sup> cells were obtained.

To estimate purity,  $1 \times 10^6$  cells from both negative and positive fractions were incubated with 10  $\mu$ l of CD19-APC and 10  $\mu$ l of CD45-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA), and analyzed in a FACS Verse flow cytometer (BD Biosciences).

### RNA isolation and GeneChip expression analysis

Total RNA from B cells was extracted using the TRIzol reagent and kept at  $-80$  °C until use. RNA integrity number (RIN) was tested by means of the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and RNA



concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm using a spectrophotometer (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences). In the present study, 14 microarrays were developed and analyzed: eight for OVX mice and six for SHAM mice.

The synthesis of cDNA and cRNA, labeling, hybridization, and scanning of the samples were performed according to the WT Plus Reagent Kit Manual (Affymetrix Ltd., UK), as previously described [15]. To prepare the hybridization cocktail, 5.5 µg of fragmented biotinylated cRNA were used. Subsequently, this cocktail was hybridized for 18 h at 45 °C for the Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 Array, which contains more of 33,000 gene-level probe sets. Arrays were washed, scanned, and gene expression data were imported into Partek Genomics Suite (Partek, Inc., St. Louis, MO) as CEL files as described [15]. Raw data were pre-processed, which included background correction, normalization, and summarization using robust multi-array average (RMA) analysis and then log<sub>2</sub>-transformed. Data QC identified one outlier array in the SHAM group. Data from this sample was not included in any downstream analysis. To determine global differences between genetic profiles of groups, principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering using the Partek software was performed. ANOVA was used to detect DEG using a false discovery rate (FDR) of <0.05.

#### Microarray data validation by MassARRAY QGE and qPCR

To validate the results obtained in the microarray experiment, we use both MALDI-TOF mass spectrometry (Sequenom, CA, USA) as well as qPCRs. In the MALDI-TOF analysis, we analyze four replicates of each RNA (7 for OVX group and 5 for SHAM group because of number limitation) for 11 genes using eight dilutions of competitor in each experiment. In addition, four housekeeping genes (*Gadph*, *Actb*, *Hprt1*, and *Tubb5*) were used to normalize gene expression.

For each gene, a 70- to 120-bp region of identical sequence with one single mismatch was selected according to the analysis done by the Sequenom software. One microgram of total RNA was reverse transcribed (RT) into cDNA using the “High Capacity RNA-to-cDNA Kit” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and a combination of random octamers and oligo(dT) mix. This cDNA was diluted 1/10 in water. Then, 1 µl of this dilution and a synthetic competitor that had another SNP mismatch served as templates for competitive PCR. The design of the primers and competitors (see Supplemental Table 1 for sequences), the removal of excess dNTPs, the primer extension reaction, and the RNA quantification were performed as described [15].

Validation by qPCR was performed in all RNA samples. Three hundred nanograms of total RNA were RT into cDNA using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) with a

mix of random hexamers and oligo(dT). After RT, gene expression was determined by means of TaqMan probes, in triplicate, by real-time PCR on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The controls for RT, the qPCR conditions, and the relative quantification of gene expression was performed as previously described [18], except that in the present study, gene expression was normalized against three housekeeping genes (*Gapdh*, *Hprt1*, and *Actb*).

#### Subjects

For association studies, we evaluated the cohort that we have used in previous studies [15, 19, 20]. Briefly, we analyzed 895 women of Spanish ancestry living in Valencia, in the east of Spain, with natural menopause or who underwent bilateral oophorectomy before menopause. These women were recruited from the Menopause Unit or from the Orthopedic Surgery and Traumatology Service of the Hospital Clínico of Valencia. Exclusion criteria in this study were a history of bone disease other than primary osteoporosis, hyperparathyroidism, malignancy diagnosed before the densitometric study that needed chemotherapy, the use of corticosteroids or drugs not used in hormone therapy (HT) known to alter bone mass before the densitometric study, and those under 35 years of age.

Blood was drawn from the women to obtain DNA. The women were measured and weighed to determine their BMI [19]. Each woman received a questionnaire on risk factors for osteoporosis, and the data were recorded and contrasted with the data obtained from the clinical history. Age, BMI, and HT-use were used as covariates in the analysis of the data. According to medical records and collected data, 9.3% of women suffered an osteoporotic FF, understood as any fracture of low impact except in the fingers, toes, nose, and skull. Some of them had to be treated in the Hospital Clínico.

The research was carried out according to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). The local Ethics Committee approved the study, and written informed consent was obtained from women in accordance with the guidelines of the Institute of Health Research INCLIVA.

#### Bone mineral density data

In the present study, almost all of the women underwent a densitometric study by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the non-dominant proximal femoral neck (FN-BMD) and at the lumbar spine from L2-L4 (LS-BMD). The study used a Norland XR-36 (Norland Medical Systems Inc., Fort Atkinson, WI, USA), a Lunar DPX (GE Lunar Corporation, Madison, WI, USA), or a Hologic (Hologic Explorer, Marlborough, MA, USA) densitometer. In order to

manage BMDs performed with different densitometers, a standardized BMD (sBMD) was calculated [21, 22].

### Single nucleotide polymorphisms and genotyping

The present study analyzed the association of nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in nine genes with bone phenotypes (Supplemental Table 2). The genes were selected among the most significantly altered biological processes in B cells of the BM after OVX (Gene Ontology; see below). Of the selected genes, seven of them showed significant differential expression (increased expression: *HDAC5*, *SOX4*, and *TNFRSF19*; decreased: *CD80*, *SOX6*, *MMP9*, and *TYROBP*), while two of them did not show any change (*CD86* and *IL18*) (Supplemental Table 3). The *CD86* gene was chosen because of its close functional relationship with *CD80*, while the *IL-18* gene was chosen because a differential expression for the gene encoding an accessory protein for the *IL-18* receptor (*IL18RAP*) was detected. Of the selected genes, only three of them had been previously associated with bone phenotypes in women, *HDAC5*, *SOX4*, and *SOX6* [23–26]. In this case, our intention was to replicate previous results.

The remaining genes have been selected based on published data. Thus, *CD80* and *CD86* inhibit osteoclast differentiation by inducing the *IDO*/tryptophan pathway [27]. *IL-18* is regulated by *PTH* and required for its anabolic function [28]. *TNFRSF19* is a target of *RUNX2*, contributing to osteoblastogenesis regulation [29]. *TYROBP* (*DAP-12*) is essential for a correct osteoclastogenesis [30]. *MMP9* deficiency causes altered fracture repair [31]. Finally, there is a description of an association of SNPs in the *MMP9* gene with BMD in a Japanese population, but only in men [32].

The SNPs were chosen based on previous data about prior association studies or functionality. The possible functionality of SNPs was assessed using the GenePipe software (<http://genepipe.ncgm.sinica.edu.tw/>). For the *HDAC5* and *SOX6* genes, the previously described SNPs, rs228769 and rs7117858, respectively, associated to bone phenotypes, were selected [26]. For the *IL-18* and *MMP9* genes, the SNPs rs1946518 and rs17576, respectively, were selected as functional variants affecting gene expression [33, 34]. The SNP rs9550987 of the *TNFRSF19* gene was chosen because it generates a missense change in the protein (Ser31Thr). For the selection of the remaining SNPs, the dbSNP database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was used, and SNPs were chosen based on an adequate heterozygosity and with a minor allele frequency (MAF) in Caucasians of >5%.

Obtaining DNA from blood samples and genotyping of the SNPs by allelic discrimination using TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) and quality control was performed as previously described [20].

### Statistical analysis

The mouse experiments used statistical tests incorporated into the Partek Genomic Suite software with a threshold of FDR <0.05. The validation of genes by MALDI-TOF mass spectrometry and through qPCRs used the Student's *t* test. The human studies used the SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snstats>) [35] both to test the homogeneity of the population by testing the genotypic frequencies against the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), as well as to know the model of inheritance (co-dominant, dominant, overdominant, and recessive).

Fixed-effects designs of analysis of variance (ANOVA) and covariance (ANCOVA) were used for comparisons of means between groups. ANCOVA and logistic regression analyses were used for comparing bone variables among genotypes. The bone variables were adjusted for the covariates age and BMI. The covariate “HT-use” was entered into the statistical models as a fixed factor because of its dichotomic nature. Multiple logistic regression analysis with covariates was done to estimate the osteoporosis risk of genotypes by stepwise backward elimination. For each SNP studied, the distribution of genotypes and the presence or absence of FF were compared using the  $\chi^2$  test.

We estimated a sample size of 893 to be sufficient to obtain an 85% statistical power. This was in order to detect a gene effect of  $R^2 = 0.010$  (assessed by regression analysis between LS-BMD and rs867234) according to a frequency for the C allele of 0.17 (Supplemental Table 2) under a recessive model of inheritance and a mean  $\pm$  SD for LS-BMD of  $0.987 \pm 0.151$  g/cm<sup>2</sup> (see below). The QUANTO software package (<http://hydra.usc.edu/GxE/>) was used for this estimation.

Values shown are means  $\pm$  SD and frequencies, unless otherwise specified. All analyses were two-tailed, and significance was defined as  $P < 0.05$ . Except when indicated, all data were analyzed using the IBM SPSS statistics for Windows (version 22.0, IBM Corp, Armonk, NY).

## Results

### Positive selection of B cells from BM of mice and RNA quality

We obtained the BM from femora of all mice since none of them exhibited evidence of side effects during the experiment. The percentage of CD19<sup>+</sup> cells in the positive fraction was  $91 \pm 8.2\%$ . Characteristic histograms obtained can be seen in Supplemental Fig. 1. The median of the RIN value was  $9.93 \pm 0.15$ , indicating a very good, intact RNA obtained from immunopurified B cells.

### Microarray analysis and DEG after OVX

Figure 1 shows the principal component analysis (PCA) and the hierarchical clustering of samples studied. PCA was applied to detect the interrelationships between OVX and SHAM samples. The groups were separated into two distinct sets, indicating that the gene expression profile of both groups was essentially different. This was confirmed by the dendrogram from hierarchical clustering analysis. Samples of RNA from OVX mice were separated into a different cluster from those of SHAM samples, indicating that they were organized into different hierarchies.

Analysis with the Partek software showed 2791 significant transcripts (FDR <0.05), belonging to 2621 annotated genes (Supplemental Table 3). Of these, 1569 genes were upregulated (56.2%) and 1122 were downregulated (43.8%).

### Identification and functional classification of DEG after OVX

Insights into the biological processes differentially expressed in the OVX group in comparison to those for the control group were investigated through functional annotation analysis using Pathway Studio 10 (Ariadne Genomics, Rockville, MD, USA). The top 26 most significant gene clusters are shown in Supplemental Table 4, ranking between  $P$  values of  $1.6 \times 10^{-48}$  and  $3.7 \times 10^{-15}$ . Some of the main processes represented in these 26 gene clusters were transcription (clusters 1, 4, 7, 9, 11, and 14), transport (clusters 3, 16, and 25), immune system and inflammation (clusters 5, 21, and 22), phosphorylation (clusters 6 and 12), and apoptosis (clusters 17 and 26), among others.

All the genes selected for the translation study to humans are differentially expressed in these first 26 mouse gene clusters. Thus, for example, the *Sox6*, *Hdac5*, and *Sox4* genes are in the first gene cluster (regulation of transcription, DNA-templated), *CD80* and *Tyrbp* are in the fifth gene cluster (innate immune response), while the *Tnfrsf19*, *Il18rap*, and *Mmp9* genes are in clusters 17 (apoptotic process), 21 (inflammatory response), and 26 (positive regulation of apoptotic process), respectively.

DEG were also subcategorized according to pathways described by the Protein ANnotation THrough Evolutionary Relationship (PANTHER) [36], performed using the GeneCodis web tool [37], in order to determine the dominant molecular/reaction pathways. Note that among the 10 most significant pathways are the inflammation mediated by the chemokine and cytokine signaling pathway ( $P = 1.7 \times 10^{-13}$ ), the interleukin signaling pathway ( $P = 4.6 \times 10^{-8}$ ), and the B cell activation pathway ( $P = 1.9 \times 10^{-7}$ ). Pathways related to bone metabolism appear in position 14 (TGF-beta signaling pathway,  $P = 7.3 \times 10^{-5}$ ) in position 22 (oxidative stress response,  $P = 1.3 \times 10^{-4}$ ), and in

position 25 (Wnt-signaling pathway,  $P = 4.1 \times 10^{-4}$ ) (Supplemental Fig. 2).

### Microarray analysis validation by MassARRAY QGE analysis and qPCR

In order to validate the gene expression results obtained by the microarray analysis, MassARRAY QGE (for 11 genes) and qPCR (for 5 genes) analyses were performed using the same RNA samples analyzed in the microarray experiment (Table 1). The validations by Sequenom and qPCR yielded similar values of fold changes to those obtained by microarray analysis. Moreover, the analyses of the 16 genes detected significant differences between the OVX and SHAM mice, indicating that the results of the microarray study provided reliable comparisons between both groups of mice.

### Association of selected SNPs with bone phenotypes in the cohort of women

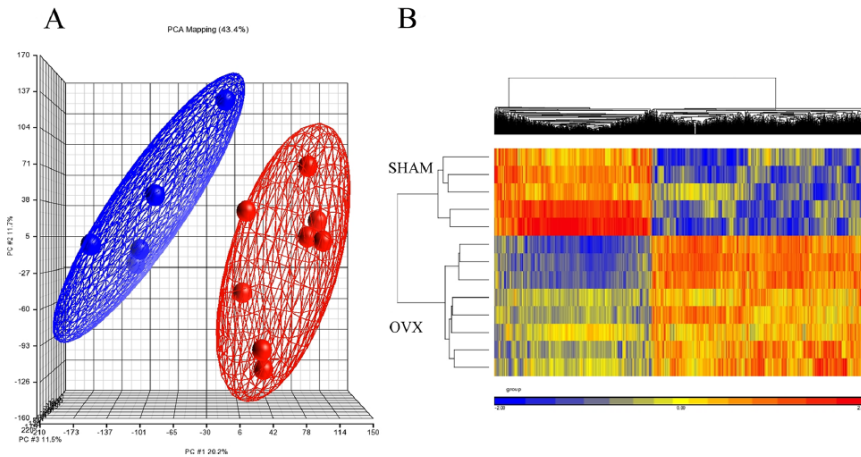
The main characteristics of the SNPs studied are in the Supplemental Table 2. The genotyping rate was >99%. The MAF was >5% for all the SNPs analyzed, all SNPs met the HWE, and GenePipe assigned a medium risk to only SNP rs9550987 (Ser31Thr) of the *TNFRSF19* gene and low risk to the SNP rs17576 (Gln279Arg) of the *MMP9* gene. The allelic frequencies were similar to those reported in other Caucasian populations.

The main characteristics of the 895 participants in the study are listed in Table 2. Note that women displayed normal bone parameters according to their median age (FN T-score  $-1.044 \pm 1.036$ ; LS T-score  $-1.223 \pm 1.365$ ).

A preliminary study, by means of ANOVA (not shown), detected significant and/or suggestive associations for several SNPs with BMD. Table 3 shows the SNPs, using the best inheritance model, whose associations were significant (nominal  $P$  values) with FN- or LS-sBMD. SNP rs867234 of the *CD80* gene showed a trend to be associated with FN-sBMD ( $P = 0.071$ ), but it was significant with LS-sBMD. However, after adjusting for covariates, only the association with LS-sBMD remained significant. Similarly, SNPs rs2681406 and rs228769 of the *CD86* and *HDAC5* genes, respectively, were significantly associated with both FN and LS-sBMD, although after adjusting for covariates, only the association with FN-sBMD remained significant. Nevertheless, there was a clear trend of SNP rs228769 in the *HDAC5* gene with LS-sBMD ( $P = 0.054$ ). However, when we adjusted the number of tested SNPs with the Bonferroni correction (0.05/number of SNPs), only the association of the SNP in the *CD80* gene remained significant ( $P < 0.006$ ).

Table 4 shows a multiple logistic regression model, adjusted for covariates, to evaluate the risk of FN and LS osteoporosis. Table 4 shows the genotypes that entered into the model





**Fig. 1** a Principal components analysis (PCA) and b hierarchical clustering of transcriptome data from SHAM (blue) and OVX (red) mice

in addition to age ( $P < 0.000$ , for both FN as LS osteoporosis) and BMI ( $P < 0.000$  for LS osteoporosis and  $P < 0.05$  for FN osteoporosis). The covariate HT-dise did not entered into any model in any case. In addition to the SNPs in the *CD80*, *CD86*, and *HDAC5* genes that were associated to varying degrees with BMD and risk of osteoporosis in both skeletal sites (nominal  $P$  values), Table 4 also shows the SNPs of the *MMP9* (risk genotype A/A, OR = 1.82,  $P = 0.068$ ) and *SOX4*

(risk genotype C/C, OR = 1.61,  $P = 0.052$ ) genes. Considering multiple testing, only the association of the *CD80* gene passed the Bonferroni threshold.

Finally, the associations of each SNP to the FF phenotype were studied using the  $\chi^2$  test (Table 5). In this case, if the nominal  $P$  values are considered, there were associations of FF with the SNP of the *CD80* gene (12.3% of FF in the G/C-C/C genotype vs. 7.9% in the G/G genotype) and,

**Table 1** Validation of microarray results by MassARRAY QGE analysis (Sequenom) and by real-time PCR (qPCR)

Validation technology	Gene	Fold change from microarrays (Partek)	Ratio OVX/SHAM	$P$ value	
Sequenom	<i>Itch</i>	2.32	3.24	0.000005	
	<i>Tet1</i>	1.49	2.19	0.0006	
	<i>Lef1</i>	1.48	2.31	0.000008	
	<i>Sox4</i>	1.40	2.36	0.02	
	<i>Arrb1</i>	-1.72	-2.51	0.0002	
	<i>Fosl2</i>	-1.97	-2.71	0.00005	
	<i>Ccl3</i>	-2.47	-1.97	0.01	
	<i>Ccl5</i>	-2.56	-2.56	0.0002	
	<i>Mmp9</i>	-2.84	-1.96	0.0007	
	<i>Aldh1a1</i>	-3.50	-3.05	0.0001	
	<i>Fpr2</i>	-3.53	-3.16	0.00007	
	qPCR	<i>Hdac5</i>	2.48	1.68	0.003
		<i>Tnfrsf19</i>	1.62	1.64	0.0005
<i>Smad5</i>		1.38	1.56	0.005	
<i>Clec5a</i>		-3.24	-2.77	0.005	
<i>Sox6</i>		-3.39	-3.88	0.00005	

The fold change obtained from the analysis of microarrays with the Partek software is shown. The ratio of OVX/SHAM obtained from Sequenom analysis results from dividing the molar concentration of each gene between OVX mice (seven animals) and SHAM mice (five animals). The ratio of OVX/SHAM obtained from qPCR is obtained by dividing the relative expression for each gene between OVX mice (eight animals) and SHAM mice (six animals)

**Table 2** Anthropometric and bone characteristics of the postmenopausal Spanish female cohort studied (mean ± SD or percentage)

	Number	Values
Age (year)	895	55.5 ± 8.6
Years since menopause (year)	895	7.0 ± 6.5
Weight (kg)	895	66.3 ± 11.2
Height (cm)	895	157.3 ± 6.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	895	26.9 ± 4.5
HT user (%)	895	27.8
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	888	0.791 ± 0.121
FN T-score	888	-1.044 ± 1.036
FN Z-score	888	-0.110 ± 0.950
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	868	0.987 ± 0.151
LS T-score	868	-1.223 ± 1.365
LS Z-score	868	-0.175 ± 1.220

BMI body mass index, HT hormone therapy, BMD bone mineral density, FN femoral neck, LS lumbar spine

interestingly, in the *SOX6* gene (11.3% of FF in the A/A genotype vs. 6.9% in the G/G-G/A genotype). In this analysis, none of the associations reached the Bonferroni threshold.

**Discussion**

Over the last several years, considerable effort has been made to characterize the genetic architecture of osteoporosis and FF. Indeed, numerous GWAS and meta-analyses performed in large cohorts have identified new genes and signaling pathways that govern the pathophysiology of these phenotypes [3, 38]. Despite this effort, the consensus is that we are able to explain but a small part of the heritability associated with these phenotypes [24]. Among the causes held out are the

formidable imposition of the statistical treatment of multiple comparisons and the possible inflation of phenotypes’ heritability [39]. As a result, in recent years, there has been an attempt to characterize this missing heritability through other approaches, such as the analysis of structural and rare variants, epigenetic phenomena, and epistasis [40].

Another alternative to identify genes in human complex traits is the translational study from animal models, as presented here. In our previous description of this approach, the association with BMD in women of SNPs derived from DEG in the total BM of OVX mice was detected [15]. Given that the functional annotation of DEG has pointed to the involvement of B cells, and that this cell has been implicated in bone metabolism, the present study was deemed necessary. The main objective has been to detect DEG in B cells obtained from BM of OVX mice and translate the study to humans. To our knowledge, this is the first time that this approach has been performed.

The present study has discovered 2791 differentially expressed transcripts belonging to 2621 annotated genes, 16 of which were validated by other techniques (MassARRAY QGE and qPCR) with 100% reproducibility (Table 1). These data have helped to support the robustness of the results obtained by microarray study. The analysis of biological processes showed transcription, transport, immune system and inflammation, phosphorylation, apoptosis, and chromatin modification as the main processes differentially expressed in B cells of BM from OVX mice (Supplemental Table 4). Moreover, the analysis with PANTHER also showed pathways closely related to the pathophysiology of osteoporosis: inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling, interleukin signaling, B cell activation, TGF-beta signaling, oxidative stress response, and Wnt-signaling [41].

After the analysis of global gene expression in mice, nine genes were selected for further study by analyzing their

**Table 3** Analysis of the association between genotypes and bone phenotypes, unadjusted and adjusted for confounding variables: age, BMI, and HT-use

Gene SNP (rs)	Genotype	FN-sBMD		Genotype	LS-sBMD	
		Unadjusted	Adjusted		Unadjusted	Adjusted
<i>CD80</i> rs867234	G/G	0.796 ± 0.122	0.800 ± 0.005	G/G–G/C	0.989 ± 0.150	0.991 ± 0.005
	G/C–C/C	0.780 ± 0.118	0.793 ± 0.007	C/C	0.899 ± 0.156	0.911 ± 0.028
	<i>P</i> value	0.071	0.364	<i>P</i> value	0.002	0.004
<i>CD86</i> rs2681406	T/T	0.785 ± 0.125	0.792 ± 0.005	T/T	0.979 ± 0.155	0.984 ± 0.006
	T/C–C/C	0.802 ± 0.114	0.810 ± 0.007	T/C–C/C	1.001 ± 0.142	0.998 ± 0.009
	<i>P</i> value	0.049	0.033	<i>P</i> value	0.044	0.198
<i>HDAC5</i> rs228769	C/C	0.783 ± 0.119	0.790 ± 0.005	C/C	0.977 ± 0.148	0.981 ± 0.007
	C/G–G/G	0.803 ± 0.125	0.810 ± 0.006	C/G–G/G	1.001 ± 0.155	1.001 ± 0.008
	<i>P</i> value	0.017	0.012	<i>P</i> value	0.028	0.054

In order to simplify, only the values for significant SNPs are shown

**Table 4** Estimation of the risk for femoral neck and lumbar spine osteoporosis, adjusted by age, BMI, and HT-use, according to genotype and to the model of inheritance

SNP (gene)	Phenotype	Genotype (N)	Cases (%) <sup>a</sup>	Adjusted OR (95% CI)	P value
rs867234 ( <i>CD80</i> )	LS osteoporosis	G/G–G/C (834)	17.4	1	0.002
		C/C (27)	44.4	3.72 (1.64–8.44)	
rs2681406 ( <i>CD86</i> )	FN osteoporosis	T/C–C/C (285)	5.2	1	0.028
		T/T (548)	8.2	2.71 (1.11–6.62)	
	LS osteoporosis	T/C–C/C (281)	12.8	1	0.020
		T/T (534)	21.2	1.67 (1.08–2.58)	
rs228769 ( <i>HDAC5</i> )	FN osteoporosis	C/G–G/G (354)	5.9	1	0.054
		C/C (496)	8.5	2.05 (0.99–4.24)	
	LS osteoporosis	C/G–G/G (346)	16.2	1	0.087
		C/C (484)	19.6	1.42 (0.95–2.11)	
rs17576 ( <i>MMP9</i> )	FN osteoporosis	A/G–G/G (511)	6.1	1	0.068
		A/A (366)	9.0	1.82 (0.96–3.45)	
rs1620996 ( <i>SOX4</i> )	LS osteoporosis	T/T–T/C (206)	14.1	1	0.052
		C/C (653)	19.8	1.61 (1.00–2.60)	

OR odds ratio, CI confidence interval

<sup>a</sup> The percentage of women with the given genotype who displayed femoral neck or lumbar spine osteoporosis (T-score  $\leq -2.5$ )

association with bone phenotypes in postmenopausal women. As noted in the “Results” section, these selected genes were in the 26 most significant mouse gene clusters: regulation of transcription, DNA-templated (*Sox6*, *Hdac5*, and *Sox4*), innate immune response (*CD80* and *Tyrbp*), apoptosis (*Tnfrsf19*), inflammatory response (*Il18rap*), and positive regulation of apoptosis (*Mmp9*). All these processes were related with phenotypes and/or bone cellular processes [27–31, 42]. In brief, the main criteria for selection were, on the one hand, the replication of previous results (*HDAC5*, *SOX4*, and *SOX6*) and, on the other hand, genes whose biological function is relevant to bone physiology (all the others).

Regarding the BMD (Table 3), the SNPs in the *HDAC5* and *CD86* genes were significantly associated (nominal *P* value) with FN-sBMD, while the SNP of the *CD80* gene was associated with LS-sBMD. The association with *HDAC5* is not new because this gene has been previously associated with FN-BMD [26]. *HDAC5* is a ubiquitously expressed class II histone deacetylase responsible for the deacetylation of lysine residues of H2A, H2B, H3, and H4 histones. *HDAC5* is implicated in multiple processes. In bone, recruitment *HDAC5* is needed for TGF- $\beta$ -mediated osteoblast differentiation [43], and it controls the expression of sclerostin in osteocytes through the inhibition of MEF2C, a transcription factor crucial for *SOST* expression [44].

The present study shows for the first time, however, that variants in the *CD80* and *CD86* genes are associated with bone phenotypes, although only *CD80* passed the Bonferroni threshold. *CD80* (also B7-1) and *CD86* (B7-2) are proteins expressed on antigen-presenting cells that work

in tandem to provide the costimulatory signals necessary for T cell activation and survival. In order to explain this association with BMD, it has been described that *CD80* and *CD86* inhibit osteoclast differentiation [27]. Indeed, the pair of molecules *CD80/86* act as a negative regulator for the generation of osteoclasts, and consequently, *CD80/86*-deficient mice were osteopenic because of increased osteoclast differentiation. Mechanistically, the engagement of *CD80/86* to CTLA-4 induces the activation of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in osteoclast precursors, which degrades tryptophan and promotes apoptosis [27]. Besides this function, there is the expression of *CD80/86* in cultured human osteoblast, so that genetic variations in these genes could have a direct effect on the osteoblast [45].

With regard to the risk of osteoporosis estimated using logistic regression adjusted for covariates, in addition to the *CD80*, *CD86*, and *HDAC5* genes, the SNPs of the *MMP9* and

**Table 5** Association of SNPs with the prevalence of osteoporotic fractures according to the model of inheritance

SNP (gene)	Genotype (N)	Cases (%) <sup>a</sup>	$\chi^2$	P value
rs867234 ( <i>CD80</i> )	G/G (611)	7.9	3.93	0.047
	G/C–C/C (277)	12.3		
rs7117858 ( <i>SOX6</i> )	G/G–G/A (356)	6.9	5.25	0.022
	A/A (533)	11.3		

The values shown are after a Yates correction for  $2 \times 2$  tables

<sup>a</sup> The percentage of women with the given genotype who suffered an osteoporotic fracture

*SOX4* genes also entered into the regression equations according to their nominal *P* values, although only the association of *CD80* remained significant after Bonferroni correction (Table 4). Variants in the *SOX4* gene have been previously associated with BMD [23, 24]. The *SOX4* gene belongs to the SOX family of transcription factors that are involved in the regulation of embryonic development and in the determination of cell fate [46]. With respect to bone, *Sox4*<sup>+/-</sup> mice display osteopenia and diminished cortical and trabecular bone volume, and this protein seems to mediate the downstream effects of PTH and PTHrP in bone development [47].

Detection of *MMP9* gene variants associated with an increased risk of osteoporosis in women, described in the present study, is novel, although an association of SNPs in the *MMP9* gene with BMD has been described in men [32]. *MMP9* mediates the vascular invasion of the hypertrophic cartilage callus, and *Mmp9*<sup>+/-</sup> mice have non-unions and delayed unions of their fractures caused by persistent cartilage at the fracture site. These deficient mice generate a large cartilage callus even when fractured bones are stabilized, which implicates *MMP9* in the regulation of chondrogenic and osteogenic cell differentiation during the initial stages of repair [31].

Finally, two of the genes were associated (nominal *P* values) with FF, *CD80* and *SOX6* (Table 5). *SOX6* has been previously associated with BMD and obesity, but not with FF [25, 26]. Like *SOX4*, *SOX6* is a member of the SOX family of transcription factors. *SOX6*, together with *SOX5*, is expressed in the cartilage and has an essential role in chondrocyte differentiation, cartilage formation, and hence, endochondral bone formation [48]. Consequently, genetic variation in this gene might affect BMD and/or FF risk by playing a role in skeletal development.

In the present study, several associations of SNPs to bone phenotypes have shown nominal significance, even though they have not passed the Bonferroni threshold. That notwithstanding, it is important to bear in mind that the Bonferroni correction is extremely conservative and leads to a high rate of false negatives. In addition, it does not take into account the potential correlations between SNPs due to, for example, linkage disequilibrium. Although there are other less conservative procedures, all these statistical corrections may lead to “salami tactics” (i.e., researchers publishing only one association each time) [49]. In any case, the fact that the associations of *CD80* and bone phenotypes described in the present study passed the Bonferroni threshold endorses the statistical significance of associations.

The present study has some limitations. The mice were sacrificed 4 weeks after OVX. The rationale was to avoid changes in gene expression caused by surgery and/or postsurgical inflammation. Consequently, with this design, it is possible that information on the early days post-OVX may have been lost. Moreover, our model is more similar to women’s

lives 5–10 years after menopause. Another limitation has been to study only a cohort of Caucasian postmenopausal women, so it is not clear that the results can be extrapolated to women of other ethnicities or even to men. In addition, the sample size is medium, although with an adequate statistical power, and three different DXA devices have done the BMD assessment, so we have had to calculate a standardized BMD. Moreover, the design of the study is clinical and volunteer based, not population based. Finally, there is no information about participant physical activity and dietary habits, especially regarding the intake of vitamin D. This vitamin has an immunoregulatory role affecting T and B cell functions [50]. To avoid false positives, however, the study analyzes a population of a particular geographic region, having discarded substructures, and we have used covariates in the statistical analysis.

## Conclusions

To conclude, this study has identified genes that show differential expression in B cells obtained from BM of OVX mice compared to that for controls. In the translational approach, six of the nine selected genes have been associated with some of the bone phenotypes analyzed, attending to their nominal *P* values. This is the first time an association with bone phenotypes of SNPs in the *CD80*, *CD86*, and *MMP9* genes has been described in postmenopausal women. However, only *CD80* associations were significant after applying the Bonferroni correction. The present findings confirm that the use of translational approximations from animal models is useful for the identification of genes associated with bone phenotypes.

**Acknowledgements** The authors are indebted to Mrs. R. Aliaga and Dr. V. Ballester for their excellent technical assistance. This work was supported by Grant P112/02582 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, Madrid, Spain), including funds from the EU FEDER Program. Layla Panach is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Programa de Formación del Profesorado Universitario).

**Compliance with ethical standards** The research was carried out according to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). The local Ethics Committee approved the study, and written informed consent was obtained from women in accordance with the guidelines of the Institute of Health Research INCLIVA.

**Conflicts of interest** None.

## References

1. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H et al (2013) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 24:23–57. doi:10.1007/s00198-012-2074-y



2. Khosla S, Melton LJ, Riggs BL (2011) The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res* 26:441–451. doi:10.1002/jbmr.262
3. Liu Y, Zhang L, Papiasian CJ, Deng H (2014) Genome-wide association studies for osteoporosis: a 2013 update. *J Bone Metab* 21:99–116. doi:10.11005/jbm.2014.21.2.99
4. Hsu YH, Kiel DP (2012) Genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab* 97:1958–1977. doi:10.1210/jc.2012-1890
5. Ralston SH, Uitterlinden AG (2010) Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 31:629–662. doi:10.1210/er.2009-0044
6. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ et al (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461:747–753. doi:10.1038/nature08494
7. Eichler EE, Flint J, Gibson G et al (2010) Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex diseases. *Nat Rev Genet* 11:446–450. doi:10.1038/nrg2809
8. Arron JR, Choi Y (2000) Bone versus immune system. *Nature* 408:535–536. doi:10.1038/35046196
9. Kong Y, Feige U, Sarosi I et al (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304–309
10. Pacifici R (2012) Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *J Bone Miner Res* 27:231–239. doi:10.1002/jbmr.1500
11. Li J-Y, Tawfeek H, Bedi B et al (2011) Ovariectomy deregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:768–773. doi:10.1073/pnas.1013492108
12. Pacifici R (2013) Osteoimmunology and its implications for transplantation. *Am J Transplant* 13:2245–2254. doi:10.1111/ajt.12380
13. Li Y, Toraldo G, Li A et al (2007) B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 109:3839–3848. doi:10.1182/blood-2006-07-037994
14. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179. doi:10.1038/36593
15. Pineda B, Serna E, Laguna-Fernández A et al (2014) Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: a functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women. *Bone* 65:33–41. doi:10.1016/j.bone.2014.05.001
16. García-Pérez MA, Noguera I, Hermenegildo C et al (2006) Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum Reprod* 21:880–887. doi:10.1093/humrep/dei413
17. García-Pérez MA, Del Val R, Noguera I et al (2006) Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19:807–819
18. Pineda B, Hermenegildo C, Tarín JJ et al (2012) Effects of administration of hormone therapy or raloxifene on the immune system and on biochemical markers of bone remodeling. *Menopause* 19:319–327. doi:10.1097/gme.0b013e3182310a98
19. Panach L, Pineda B, Mifsut D et al (2016) The role of CD40 and CD40L in bone mineral density and in osteoporosis risk: a genetic and functional study. *Bone* 83:94–103. doi:10.1016/j.bone.2015.11.002
20. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ et al (2014) Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women. *J Bone Miner Metab* 32:691–698. doi:10.1007/s00774-013-0539-5
21. Hui SL, Gao S, Zhou XH et al (1997) Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J Bone Miner Res* 12:1463–1470. doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1463
22. Lu Y, Fuerst T, Hui S, Genant HK (2001) Standardization of bone mineral density at femoral neck, trochanter and Ward 's triangle. *Osteoporos Int* 12:438–444
23. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP et al (2011) Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 7:1–10. doi:10.1371/journal.pgen.1001372
24. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E et al (2012) Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 44:491–501. doi:10.1038/ng.2249
25. Liu Y-Z, Pei Y-F, Liu J-F et al (2009) Powerful bivariate genome-wide association analyses suggest the SOX6 Gene influencing both obesity and osteoporosis phenotypes in males. *PLoS One* 4:e6827. doi:10.1371/journal.pone.0006827
26. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K et al (2009) Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 41:1199–1206. doi:10.1038/ng.446
27. Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R et al (2014) T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med* 6:235ra60–235ra60
28. Raggatt LJ, Qin L, Tamasi J et al (2008) Interleukin-18 is regulated by parathyroid hormone and is required for its bone anabolic actions. *J Biol Chem* 283:6790–6798. doi:10.1074/jbc.M709909200
29. Wu H, Whitfield TW, Gordon JAR et al (2014) Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol* 15:R52. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r52
30. Koga T, Inui M, Inoue K et al (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428:758–763. doi:10.1038/nature02444
31. Colnot C, Thompson Z, Miclau T et al (2003) Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130:4123–4133. doi:10.1242/dev.00559
32. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H (2004) Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 gene with bone mineral density in Japanese men. *Metabolism* 53:135–137. doi:10.1016/j.metabol.2003.09.003
33. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O et al (2003) Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107:1579–1585. doi:10.1161/01.CIR.0000058700.41738.12
34. Giedraitis V, He B, Huang W, Hillert J (2001) Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 112:146–152
35. Sole X, Guino E, Valls J et al (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928–1929. doi:10.1093/bioinformatics/btl268
36. Mi H, Poudel S, Muruganujan A et al (2016) PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res* 44:D336–D342. doi:10.1093/nar/gkv1194
37. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A (2012) GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 40:W478–W483. doi:10.1093/nar/gks402
38. Rivadeneira F, Mäkitie O (2016) Osteoporosis and bone mass disorders: from gene pathways to treatments. *Trends Endocrinol Metab* 27:262–281. doi:10.1016/j.tem.2016.03.006
39. Chen X, Kuja-Halkola R, Rahman I et al (2015) Dominant genetic variation and missing heritability for human complex traits: insights from twin versus genome-wide common SNP models. *Am J Hum Genet* 97:708–714. doi:10.1016/j.ajhg.2015.10.004



40. Robinson MR, Wray NR, Visscher PM (2014) Explaining additional genetic variation in complex traits. *Trends Genet* 30:124–132. doi:10.1016/j.tig.2014.02.003
41. Weitzmann MN (2013) The role of inflammatory cytokines, the RANKL/OPG axis, and the immunoskeletal interface in physiological bone turnover and osteoporosis. *Scientifica (Cairo)* 2013:1–29. doi:10.1155/2013/125705
42. Weitzmann MN, Pacifici R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 116:1186–1194. doi:10.1172/JCI28550.1186
43. Schroeder TM, Westendorf JJ (2005) Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res* 20:2254–2263. doi:10.1359/JBMR.050813
44. Wein MN, Spatz J, Nishimori S et al (2015) HDAC5 controls MEF2C-driven sclerostin expression in osteocytes. *J Bone Miner Res* 30:400–411. doi:10.1002/jbmr.2381
45. Reyes-Botella C, Montes M, Vallecillo-Capilla M (2000) Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation by cultured human osteoblasts. *J Periodontol* 71:614–617
46. Kamachi Y, Kondoh H (2013) Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140:4129–4144
47. Nissen-Meyer LSH, Jemtland R, Gautvik VT et al (2007) Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J Cell Sci* 120:2785–2795
48. Lefebvre V, Li P, De Crombrughe B (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17:5718–5733. doi:10.1093/emboj/17.19.5718
49. Green J, Britten N (1998) Qualitative research and evidence based medicine. *BMJ* 316:1230–1232
50. Rolf L, Muñis A-H, Hupperts R, Damoiseaux J (2016) Illuminating vitamin D effects on B cells—the multiple sclerosis perspective. *Immunology* 147:275–284. doi:10.1111/imm.12572



# 9. ANEXOS



**ANEXO I.**

**Tabla A1.** Datos antropométricos y densitométricos de la Cohorte DMO.

	<b>Número</b>	<b>Valor</b>
<b>Edad (años)</b>	1166	54.51±8.87
<b>Años desde menopausia (ADM)</b>	1008	6.86±6.52
<b>Peso (kg)</b>	1064	66.22±11.02
<b>Altura (cm)</b>	1063	157.53±6.52
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	1063	26.72±4.4
<b>Estatus posmenopáusico (%)</b>	1004	86.0
<b>Usuarías TH (%)</b>	315	27.0
<b>DMOe-CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1008	0.797±0.125
<b>Valor T CF</b>	1008	-0.978±1.085
<b>Valor Z CF</b>	1007	-0.102±1.005
<b>DMOe-CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1001	0.992±0.153
<b>Valor T CL</b>	1001	-1.23±2.02
<b>Valor Z CL</b>	1000	-0.19±1.26

## **ANEXO II. Consentimiento Informado**

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Identificación de polimorfismos y genes asociados a la osteoporosis postmenopáusica: análisis genético y funcional**” que está siendo realizado por el Dr. Miguel Ángel García Pérez de la Servicio de Fundación Investigación del Hospital Clínico de Valencia y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### **Antecedentes:**

La osteoporosis es una patología esquelética que de no ser diagnosticada a tiempo puede ocasionar una fractura ósea y consecuentemente disminuir considerablemente la calidad de vida del paciente. Aunque en el desarrollo de esta patología intervienen factores tales como la dieta, los hábitos tóxicos (fumar o beber alcohol en exceso), el ejercicio físico, o determinados fármacos; el principal riesgo para sufrir osteoporosis está en los genes que heredamos cada uno. Sin embargo, en la actualidad, solo se conocen una pequeña cantidad de genes de susceptibilidad a la osteoporosis.

#### **¿Cuál es el objetivo de este estudio?**

Este proyecto de investigación pretende identificar nuevos genes y rutas metabólicas implicadas en el riesgo de sufrir osteoporosis y fractura ósea como consecuencia de esta patología.

#### **¿Por qué se le ha pedido que participe?**

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de osteoporosis, o que está siendo controlado para ello, o que va ser sometido (o ha sido sometido) a una operación quirúrgica debido a una fractura osteoporótica o de remplazo de la cadera como consecuencia de osteoporosis y/o osteoartritis.

#### **¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?**

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos una muestra sanguínea y/o muestras óseas que se le extraerán durante la operación quirúrgica de remplazo de la cadera y que de todas formas serian desechadas durante la operación. Asimismo, si su médico le receta un tratamiento, es posible que se le pida algún tubo de sangre adicional en las sucesivas extracciones sanguíneas a las que se someterá para controlar su patología y establecer si el tratamiento recetado está siendo eficaz para controlar su patología.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que este llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

#### **¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?**

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las muestras óseas que se le fueron extraídas durante el procedimiento quirúrgico o bien la toma de algún tubo adicional de sangre aprovechando la extracción que se le realizará para las distintas analíticas de rutina.

#### **¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?**

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

**¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?**

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

Si hay extracción de sangre hay que indicar: El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

**¿A quién puedo preguntar en caso de duda?**

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Miguel Ángel García Pérez en el teléfono 963983087 o bien con el Dr. Damián Mifsut Miedes, Jefe de Sección de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico de Valencia.

**Confidencialidad:**

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

**¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?**

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de tejido óseo y/o muestras sanguíneas. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Identificación de polimorfismos y genes asociados a la osteoporosis postmenopáusica: análisis genético y funcional.**

Investigador principal: *Miguel Ángel García Pérez*

Servicio: *Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de Valencia.*

Yo, \_\_\_\_\_ he sido informado por el Dr. *Damián Mifsut Miedes*, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí  No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí  No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha



**ANEXO III****Tabla A2.** Listado de miRNAs incluidos en el panel miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Serum/Plasma Focus microRNA PCR Panel, 384 wells (V3.M, EXIQON).

let-7a-5p	miR-133b	miR-185-5p	miR-223-3p	miR-324-5p	miR-484
let-7b-3p	miR-136-5p	miR-186-5p	miR-223-5p	miR-32-5p	miR-485-3p
let-7b-5p	miR-139-5p	miR-18a-3p	miR-22-3p	miR-326	miR-486-5p
let-7c	miR-140-3p	miR-18a-5p	miR-22-5p	miR-328	miR-495-3p
let-7d-3p	miR-140-5p	miR-18b-5p	miR-23a-3p	miR-331-3p	miR-497-5p
let-7d-5p	miR-141-3p	miR-190a	miR-23b-3p	miR-335-5p	miR-500a-5p
let-7e-5p	miR-142-3p	miR-191-5p	miR-24-3p	miR-338-3p	miR-501-3p
let-7f-5p	miR-142-5p	miR-192-5p	miR-25-3p	miR-339-3p	miR-502-3p
let-7g-5p	miR-143-3p	miR-193b-3p	miR-26a-5p	miR-339-5p	miR-505-3p
let-7i-3p	miR-144-3p	miR-194-5p	miR-26b-5p	miR-33a-5p	miR-532-3p
let-7i-5p	miR-144-5p	miR-195-5p	miR-27a-3p	miR-342-3p	miR-532-5p
miR-1	miR-145-5p	miR-197-3p	miR-27b-3p	miR-346	miR-543
miR-101-3p	miR-146a-5p	miR-199a-3p	miR-28-3p	miR-34a-5p	miR-551b-3p
miR-103a-3p	miR-146b-5p	miR-199a-5p	miR-28-5p	miR-361-3p	miR-574-3p
miR-106a-5p	miR-148a-3p	miR-19a-3p	miR-296-5p	miR-363-3p	miR-584-5p
miR-106b-3p	miR-148b-3p	miR-19b-3p	miR-29a-3p	miR-365a-3p	miR-590-5p
miR-106b-5p	miR-150-5p	miR-200a-3p	miR-29a-5p	miR-374a-5p	miR-605
miR-107	miR-151a-3p	miR-200c-3p	miR-29b-2-5p	miR-374b-5p	miR-629-5p
miR-10a-5p	miR-151a-5p	miR-204-5p	miR-29b-3p	miR-375	miR-652-3p
miR-10b-5p	miR-152	miR-205-5p	miR-29c-3p	miR-376a-3p	miR-660-5p
miR-122-5p	miR-154-5p	miR-208a	miR-301a-3p	miR-378a-3p	miR-766-3p
miR-125a-5p	miR-155-5p	miR-20a-3p	miR-30a-5p	miR-382-5p	miR-885-5p
miR-125b-5p	miR-15a-5p	miR-20a-5p	miR-30b-5p	miR-409-3p	miR-92a-3p
miR-126-3p	miR-15b-3p	miR-20b-5p	miR-30c-5p	miR-421	miR-92b-3p
miR-127-3p	miR-15b-5p	miR-210	miR-30d-5p	miR-423-3p	miR-93-3p
miR-128	miR-16-2-3p	miR-2110	miR-30e-3p	miR-423-5p	miR-93-5p
miR-130a-3p	miR-16-5p	miR-215	miR-30e-5p	miR-424-5p	miR-95
miR-130b-3p	miR-17-5p	miR-21-5p	miR-320a	miR-425-3p	miR-99a-5p
miR-132-3p	miR-181a-5p	miR-221-3p	miR-320b	miR-425-5p	miR-99b-5p
miR-133a	miR-182-5p	miR-222-3p	miR-324-3p	miR-451a	

## ANEXO IV

**Tabla A3.** Análisis del modelo de herencia para los distintos SNPs analizados en los genes *CD40* y *CD40L*.

Gen SNP (rs)	Genotipo	N (frecuencia)	DMOe-CF	DMOe-CL
<i>CD40</i> rs1800686	AA	45 (0.06)	0.806±0.018	1.009±0.053
	AG	265 (0.35)	0.814±0.007	1.015±0.010
	GG	457 (0.59)	0.806±0.006	1.005±0.007
	P-valor (mejor modelo)		0.49 (dominante)	0.43 (dominante)
rs752118	CC	454 (0.58)	0.807±0.006	1.005±0.007
	CT	279 (0.36)	0.812±0.007	1.014±0.010
	TT	44 (0.06)	0.807±0.018	0.999±0.026
	P-valor (mejor modelo)		0.67 (dominante)	0.54 (dominante)
rs1883832	CC	390 (0.50)	0.810±0.006	1.013±0.008
	CT	321 (0.41)	0.814±0.007	1.011±0.009
	TT	68 (0.09)	0.773±0.017	0.968±0.017
	P-valor (mejor modelo)		<b>0.015</b> (recesivo)	<b>0.027</b> (recesivo)
rs745307	AA	35 (0.05)	0.828±0.018	1.027±0.025
	AG	294 (0.38)	0.805±0.007	1.016±0.010
	GG	441 (0.57)	0.810±0.006	1.002±0.007
	P-valor (mejor modelo)		0.36 (recesivo)	0.18 (dominante)
rs4810485	GG	387 (0.50)	0.810±0.006	1.013±0.008
	GT	311 (0.41)	0.816±0.007	1.013±0.009
	TT	69 (0.09)	0.772±0.016	0.966±0.017
	P-valor (mejor modelo)		<b>0.0093</b> (recesivo)	<b>0.017</b> (recesivo)
rs11569317	CC	720 (0.93)	0.809± 0.005	1.008±0.006
	CG	53 (0.07)	0.810±0.018	1.010±0.020
	GG	1 (0.001)	0.750	0.980
	P-valor (mejor modelo)		0.62 (recesivo)	0.85 (recesivo)
rs3746821	GG	610 (0.79)	0.810±0.005	1.010±0.006
	GT	149 (0.19)	0.801±0.010	0.996±0.013
	TT	10 (0.01)	0.862±0.043	1.103±0.048
	P-valor (mejor modelo)		0.22 (recesivo)	0.064 (recesivo)
rs11569333	AA	14 (0.02)	0.796±0.322	0.975±0.034
	GA	180 (0.23)	0.820±0.009	1.022±0.013
	GG	573 (0.75)	0.807±0.005	1.004±0.006

Identificación de genes y polimorfismos asociados a fenotipos óseos

	P-valor (mejor modelo)		0.26 (dominante)	0.26 (dominante)
<b>rs3765459</b>	AA	39 (0.05)	0.807±0.018	0.994±0.027
	GA	247 (0.32)	0.814±0.008	1.009±0.010
	GG	481 (0.63)	0.807±0.006	1.009±0.007
	P-valor (mejor modelo)		0.53 (dominante)	0.57 (recesivo)
<b>CD40L</b>	AA	513 (0.66)	0.812±0.005	1.004±0.007
<b>rs3092952</b>	AG	236 (0.31)	0.802±0.008	1.019±0.011
	GG	23 (0.03)	0.793±0.026	0.997±0.039
	P-valor (mejor modelo)		0.27 (dominante)	0.27 (dominante)
<b>rs3092949</b>	AA	112 (0.14)	0.803±0.011	0.993±0.014
	GA	352 (0.46)	0.812±0.006	1.002±0.008
	GG	309 (0.40)	0.807±0.007	1.020±0.009
	P-valor (mejor modelo)		0.59 (recesivo)	<b>0.075</b> (dominante)
<b>rs3092946</b>	AA	7 (0.01)	0.751±0.050	0.992±0.059
	AT	130 (0.17)	0.812±0.011	1.045±0.016
	TT	635 (0.82)	0.809±0.005	1.001±0.006
	P-valor (mejor modelo)		0.20 (recesivo)	<b>0.0055</b> (dominante)
<b>rs1126535</b>	CC	17 (0.02)	0.807±0.034	1.040±0.046
	TC	213 (0.28)	0.809±0.008	1.030±0.011
	TT	540 (0.70)	0.808±0.005	0.998±0.007
	P-valor (mejor modelo)		0.92 (dominante)	<b>0.0097</b> (dominante)
<b>rs5930973</b>	AA	3 (0.004)	0.853±0.065	1.035±0.076
	GA	90 (0.12)	0.811±0.012	1.008±0.016
	GG	681 (0.88)	0.808±0.005	1.008±0.006
	P-valor (mejor modelo)		0.52 (recesivo)	0.76 (recesivo)
<b>rs3092923</b>	CC	6 (0.01)	0.745±0.024	1.013±0.048
	CT	141 (0.18)	0.803±0.107	1.010±0.014
	TT	629 (0.81)	0.810±0.005	1.009±0.006
	P-valor (mejor modelo)		0.2 (recesivo)	0.92 (dominante)

## ANEXO V

**Tabla A4.** Genes cuya expresión cambia significativamente con la ovariectomía. La tabla muestra la sonda de Affymetrix, el estadístico T y el P-valor que se obtiene con el software GEPAS, usado en este estudio para analizar la expresión diferencial. Un valor de estadístico T positivo indica regulación positiva, mientras que un valor negativo indica regulación negativa.

Gen	Descripción	ID sonda	T	P-valor
<i>Dntt</i>	Deoxynucleotidyltransferase, terminal	1449757_x_at	17.4	2.3E-06
<i>Slamf7</i>	SLAM family member 7	1453472_a_at	15.3	5.0E-06
<i>1700018P08RIK</i>	RIKEN cDNA 1700018P08 gene	1432854_at	13.6	9.9E-06
<i>Neil1</i>	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	1452871_at	13.0	1.3E-05
<i>Coa6</i>	Cytochrome c oxidase assembly factor 6	1429061_at	13.0	1.3E-05
<i>Sox4</i>	SRY-box containing gene 4	1449370_at, 1433575_at	12.7	1.4E-05
<i>Il7r</i>	Interleukin 7 receptor	1448575_at	12.4	1.7E-05
<i>Pold4</i>	Polymerase (DNA-directed), delta 4	1427885_at	12.4	1.7E-05
<i>Dpp4</i>	Dipeptidyl-peptidase 4	1416697_at, 1441342_at	12.3	1.7E-05
<i>Blnk</i>	B-cell linker	1451780_at	11.3	2.9E-05
<i>Cplx2</i>	Complexin 2	1436383_at	11.2	3.1E-05
<i>Bach2</i>	BTB and CNC homology 2	1437667_a_at, 1441657_at	11.1	3.3E-05
<i>Txndc11</i>	Thioredoxin domain containing 11	1448782_at	11.0	3.4E-05
<i>Xrcc6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	1417437_at	10.7	3.9E-05
<i>Sox5</i>	SRY-box containing gene 5	1440827_x_at	10.3	4.8E-05
<i>Arl5a</i>	ADP-ribosylation factor-like 5A	1433951_at	10.3	4.9E-05
<i>Gpam</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	1419499_at	10.3	5.0E-05
<i>CD79a</i>	CD79a antigen, immunoglobulin-associated alpha	1418830_at	10.3	5.0E-05
<i>CD72</i>	CD72 antigen	1426112_a_at	10.2	5.2E-05
<i>Fbxw5</i>	F-box and WD-40 domain protein 5	1417476_at	10.2	5.2E-05
<i>Csrp2</i>	Cysteine and glycine-rich protein 2	1420731_a_at	10.1	5.4E-05
<i>Cnp</i>	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1437341_x_at	10.1	5.5E-05
<i>CD93</i>	CD93 antigen	1456046_at, 1419589_at	10.0	5.8E-05
<i>Aff3</i>	AF4/FMR2 family, member 3	1433939_at	9.8	6.7E-05
<i>Foxp1</i>	Forkhead box P1	1455242_at, 1435221_at	9.8	6.7E-05
<i>Trp53i11</i>	Tumor protein p53 inducible protein 11	1436919_at	9.7	6.7E-05
<i>Capsl</i>	Calcyphosine-like	1429891_at	9.5	7.6E-05
<i>Rhoh</i>	Ras homolog gene family, member H	1429319_at	9.3	8.9E-05
<i>D10Wsu52e</i>	DNA segment, Chr 10, Wayne State University 52, expressed	1420129_s_at	9.2	9.4E-05
<i>Dnajc7</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	1448362_at	9.1	1.0E-04
<i>Ccr7</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 7	1423466_at	9.0	1.1E-04
<i>Ndufs8</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	1423908_at, 1434213_x_at	9.0	1.1E-04
<i>Wdr3</i>	WD repeat domain 3	1433746_at	8.9	1.1E-04
<i>Sec63</i>	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	1419819_s_at	8.9	1.1E-04
<i>9630023C09RIK</i>	RIKEN cDNA 9630023C09 gene	1441977_at	8.8	1.2E-04

<i>Otud7b</i>	OTU domain containing 7B	1435552_at	8.8	1.2E-04
<i>I700095J03RIK</i>	RIKEN cDNA 1700095J03 gene	1430157_at	8.7	1.3E-04
<i>Zkscan16</i>	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 16	1435407_at	8.6	1.3E-04
<i>Fhit</i>	Fragile histidine triad gene	1425893_a_at	8.6	1.3E-04
<i>Igll1</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	1420176_x_at	8.5	1.5E-04
<i>Ebpl</i>	Emopamil binding protein-like	1417298_at	8.5	1.5E-04
<i>4933439C10RIK</i>	RIKEN cDNA 4933439C10 gene	1456408_x_at, 1438437_a_at	8.4	1.5E-04
<i>Il2ra</i>	Interleukin 2 receptor, alpha	1420692_at	8.4	1.6E-04
<i>A130040M12RIK</i>	RIKEN cDNA A130040M12 gene	1428909_at	8.4	1.6E-04
<i>Cxxc5</i>	CXXC finger 5	1431469_a_at	8.3	1.6E-04
<i>Cpm</i>	Carboxypeptidase M	1429413_at, 1453009_at	8.2	1.7E-04
<i>Lrmp</i>	Lymphoid-restricted membrane protein	1448409_at	8.2	1.8E-04
<i>Rabgap11</i>	RAB GTPase activating protein 1-like	1453365_at	8.1	1.9E-04
<i>Irf4</i>	Interferon regulatory factor 4	1421173_at	8.0	2.0E-04
<i>Slamf6</i>	SLAM family member 6	1420659_at	8.0	2.0E-04
<i>Zfp706</i>	Zinc finger protein 706	1426679_at	8.0	2.1E-04
<i>D130062J21RIK</i>	RIKEN cDNA D130062J21 gene	1446929_at	7.9	2.2E-04
<i>Coq7</i>	Demethyl-Q 7	1416665_at	7.9	2.3E-04
<i>Tmem218</i>	Transmembrane protein 218	1417174_at	7.8	2.3E-04
<i>Myl4</i>	Myosin, light polypeptide 4	1422580_at	7.8	2.3E-04
<i>Syk</i>	Spleen tyrosine kinase	1418261_at	7.8	2.4E-04
<i>Cox16</i>	COX16 cytochrome c oxidase assembly homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1450895_a_at	7.8	2.4E-04
<i>Endou</i>	Endonuclease, polyU-specific	1449938_at	7.6	2.8E-04
<i>I810059H22RIK</i>	RIKEN cDNA 1810059H22 gene	1440283_at	7.5	2.9E-04
<i>Ero11b</i>	ERO1-like beta ( <i>S. cerevisiae</i> )	1434714_at	7.5	3.0E-04
<i>Vpreb3</i>	Pre-B lymphocyte 3	1422921_at	7.4	3.0E-04
<i>Spata18</i>	Spermatogenesis associated 18	1430351_at	7.4	3.0E-04
<i>2010001E11Rik</i>	RIKEN cDNA 2010001E11 gene	1451760_s_at	7.4	3.1E-04
<i>Rpl19</i>	Ribosomal protein L19	1416219_at	7.4	3.2E-04
<i>Ptprk</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	1441276_at	7.3	3.3E-04
<i>Pfdn5</i>	Prefoldin subunit 5	1460637_s_at	7.3	3.4E-04
<i>B9d2</i>	B9 protein domain 2	1427947_at	7.3	3.5E-04
<i>Chchd10</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	1436990_s_at	7.2	3.6E-04
<i>Rpl14</i>	Ribosomal protein L14	1426793_a_at	7.2	3.6E-04
<i>Pafah1b3</i>	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, subunit 3	1416410_at	7.2	3.7E-04
<i>Cnn3</i>	Calponin 3, acidic	1455570_x_at	7.2	3.7E-04
<i>2010001M09Rik</i>	RIKEN cDNA 2010001M09 gene	1428947_at	7.2	3.7E-04
<i>6330509M05RIK</i>	RIKEN cDNA 6330509M05 gene	1454897_at	7.2	3.7E-04
<i>Plekho1</i>	Pleckstrin homology domain containing, family O member 1	1417128_at	7.2	3.8E-04
<i>FAM71E1</i>	Family with sequence similarity 71, member E1	1437710_x_at	7.1	3.8E-04
<i>Pyhin1</i>	Pyrin and HIN domain family, member 1	1435330_at	7.1	3.9E-04
<i>Gh</i>	Growth hormone	1460613_x_at	7.1	3.9E-04
<i>4930563E18RIK</i>	RIKEN cDNA 4930563E18 gene	1432031_at	7.1	4.0E-04
<i>Edaradd</i>	EDAR-associated death domain	1433133_at	7.0	4.4E-04
<i>Tnfrsf19</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	1448147_at	6.9	4.5E-04
<i>Churc1</i>	Churchill domain containing 1	1425455_a_at	6.9	4.5E-04

<i>Rag1</i>	Recombination activating gene 1	1450680_at	6.9	4.5E-04
<i>Ccm2</i>	Cerebral cavernous malformation 2	1456290_x_at	6.9	4.6E-04
<i>Cecr2</i>	Cat eye syndrome chromosome region, candidate 2	1431014_at	6.9	4.6E-04
<i>Igf2bp3</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	1422610_s_at	6.9	4.6E-04
<i>Ebf1</i>	Early B-cell factor 1	1448293_at, 1416302_at	6.9	4.7E-04
<i>Ptprcap</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	1448511_at	6.9	4.7E-04
<i>Adnp2</i>	ADNP homeobox 2	1446463_at	6.8	5.0E-04
<i>Ablim1</i>	Actin binding LIM protein 1	1454708_at	6.8	5.1E-04
<i>Vill</i>	Villin 1	1448837_at	6.8	5.1E-04
<i>Gimap1</i>	GTPase, IMAP family member 1	1449988_at	6.7	5.2E-04
<i>Ccdc12</i>	Coiled-coil domain containing 12	1424517_at	6.7	5.2E-04
<i>5330403D14RIK</i>	RIKEN cDNA 5330403D14 gene	1453395_at	6.7	5.3E-04
<i>Clc5</i>	Chloride intracellular channel 5	1456873_at	6.7	5.4E-04
<i>Slc12a3</i>	Solute carrier family 12, member 3	1422856_at	6.7	5.4E-04
<i>1700021K19Rik</i>	RIKEN cDNA 1700021K19 gene	1428243_at	6.7	5.4E-04
<i>Bcat1</i>	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1450871_a_at	6.7	5.4E-04
<i>E330020D12RIK</i>	Riken cDNA E330020D12 gene	1444177_at	6.7	5.5E-04
<i>Snx30</i>	Sorting nexin family member 30	1456479_at	6.7	5.5E-04
<i>Btla</i>	B and T lymphocyte associated	1455656_at	6.6	5.7E-04
<i>Marcks</i>	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	1415971_at	6.6	5.7E-04
<i>Rnf169</i>	Ring finger protein 169	1434207_at	6.6	5.9E-04
<i>Rps3</i>	Ribosomal protein S3	1455600_at	6.6	5.9E-04
<i>Kif5c</i>	Kinesin family member 5C	1450804_at	6.6	5.9E-04
<i>Ly6d</i>	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	1416930_at	6.6	5.9E-04
<i>Plekha2</i>	Pleckstrin homology domain containing, family A	1417288_at	6.5	6.1E-04
<i>Rsph9</i>	Radial spoke head 9 homolog (Chlamydomonas)	1424763_at	6.5	6.1E-04
<i>1700030K09Rik</i>	RIKEN cDNA 1700030K09 gene	1424447_at	6.5	6.1E-04
<i>CD79b</i>	CD79b antigen	1417640_at	6.5	6.2E-04
<i>RPTOR</i>	Regulatory associated protein of MTOR, complex 1	1430784_a_at	6.5	6.3E-04
<i>CD40</i>	CD40 antigen	1449473_s_at	6.5	6.3E-04
<i>AU022436</i>	Expressed sequence AU022436	1459236_at	6.5	6.4E-04
<i>Ralgs2</i>	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	1417230_at	6.5	6.5E-04
<i>Hmg20b</i>	High-mobility group 20B	1417637_a_at	6.4	6.6E-04
<i>Lgr5</i>	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	1450988_at	6.4	6.6E-04
<i>Rps7</i>	Ribosomal protein S7	1455364_a_at	6.4	6.7E-04
<i>Unc119b</i>	Unc-119 homolog B (C. elegans)	1437961_x_at	6.4	6.8E-04
<i>Sesn3</i>	Sestrin 3	1449303_at	6.4	6.8E-04
<i>Vpreb1</i>	Pre-B lymphocyte 1	1449869_at	6.4	6.9E-04
<i>Pappa</i>	Pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	1432592_at	6.4	6.9E-04
<i>Ttc39c</i>	Tetratricopeptide repeat domain 39C	1426223_at	-6.4	6.7E-04
<i>Mapk13</i>	Mitogen-activated protein kinase 13	1448871_at	-6.4	6.6E-04
<i>Sorl1</i>	Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	1426258_at	-6.5	6.5E-04
<i>Crabp2</i>	Cellular retinoic acid binding protein 2	1451191_at	-6.5	6.5E-04
<i>Arhgef12</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor	1423902_s_at	-6.5	6.5E-04

	(GEF) 12			
<i>Kng1</i>	Kininogen 1	1426045_at	-6.5	6.4E-04
<i>Fgd4</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	1425037_at	-6.6	5.9E-04
<i>Snx15</i>	Sorting nexin 15	1424337_at	-6.6	5.9E-04
<i>Gria3</i>	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	1434728_at	-6.6	5.9E-04
<i>Mxd1</i>	MAX dimerization protein 1	1434830_at	-6.6	5.8E-04
<i>Pi16</i>	Peptidase inhibitor 16	1453839_a_at	-6.6	5.8E-04
<i>Cxcr2</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	1421734_at	-6.6	5.7E-04
<i>Dgat1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	1418295_s_at	-6.7	5.6E-04
<i>Atxn1</i>	Ataxin 1	1438294_at	-6.8	5.1E-04
<i>Pld1</i>	Phospholipase D1	1437113_s_at	-6.8	5.1E-04
<i>Irg1</i>	Immunoresponsive gene 1	1427381_at	-6.8	4.8E-04
<i>Galnt3</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	1417588_at	-7.0	4.3E-04
<i>Pnkp</i>	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase	1416378_at	-7.0	4.3E-04
<i>Lims1</i>	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	1441411_at	-7.0	4.1E-04
<i>Pqlc1</i>	PQ loop repeat containing 1	1426567_a_at	-7.1	3.9E-04
<i>Plk4</i>	Polo-like kinase 4	1419838_s_at	-7.1	3.9E-04
<i>Gdpd2</i>	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	1429076_a_at	-7.1	3.9E-04
<i>Gca</i>	Grancalcin	1424698_s_at	-7.2	3.7E-04
<i>Plcb1</i>	Phospholipase C, beta 1	1435043_at	-7.2	3.7E-04
<i>Hook3</i>	Hook homolog 3 (Drosophila)	1446737_a_at	-7.2	3.7E-04
<i>Mapkapk3</i>	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	1437494_at	-7.2	3.6E-04
<i>Ibsp</i>	Integrin-binding sialoprotein	1417484_at	-7.2	3.5E-04
<i>Tmem56</i>	Transmembrane protein 56	1434553_at	-7.3	3.3E-04
<i>Gata1</i>	GATA binding protein 1	1449232_at	-7.5	3.0E-04
<i>Ccdc158</i>	Coiled-coil domain containing 158	1442273_at	-7.5	2.9E-04
<i>Asprv1</i>	Aspartic peptidase, retroviral-like 1	1452732_at	-7.5	2.8E-04
<i>USP46</i>	Ubiquitin specific peptidase 46	1436518_at	-7.6	2.8E-04
<i>Tnfrsf13b</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1460255_at	-7.6	2.6E-04
<i>Rsad2</i>	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	1421009_at	-7.7	2.6E-04
<i>Gpi1</i>	Glucose phosphate isomerase	1420997_a_at, 1450081_x_at	-7.7	2.5E-04
<i>Top1</i>	Topoisomerase (DNA) I	1423474_at	-7.7	2.5E-04
<i>Fbxo7</i>	F-box protein 7	1452739_at	-7.7	2.5E-04
<i>Klf1</i>	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	1418600_at	-7.8	2.3E-04
<i>Tuba4a</i>	Tubulin, alpha 4a	1417373_a_at	-7.8	2.3E-04
<i>Samd9l</i>	Sterile alpha motif domain containing 9-like	1460603_at	-7.8	2.3E-04
<i>Gpx3</i>	Glutathione peroxidase 3	1449106_at	-7.8	2.3E-04
<i>Pdzd8</i>	PDZ domain containing 8	1439088_at	-7.9	2.2E-04
<i>Atrnl1</i>	Attractin-like 1	1419922_s_at	-7.9	2.1E-04
<i>Hnrpll</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	1427144_at	-8.2	1.8E-04
<i>Ppox</i>	Protoporphyrinogen oxidase	1416618_at	-8.3	1.7E-04
<i>C3</i>	Complement component 3	1423954_at	-8.6	1.4E-04
<i>2810037O22RIK</i>	RIKEN cDNA 2810037O22 gene	1428866_at	-9.1	1.0E-04
<i>B4galt6</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	1423228_at	-9.1	9.7E-05

---

<i>Tab3</i>	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3	1428762_at	-9.2	9.6E-05
<i>Met</i>	Met proto-oncogene	1434447_at	-9.2	9.3E-05
<i>2010002M12Rik</i>	RIKEN cDNA 2010002M12 gene	1457976_at	-9.4	8.4E-05
<i>Tcn2</i>	Transcobalamin II	1457825_x_at	-9.9	6.1E-05
<i>Gpr50</i>	G protein-coupled receptor 50	1455498_at	-10.0	5.7E-05
<i>Irak3</i>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	1435040_at	-10.0	5.6E-05
<i>Fpr2</i>	Formyl peptide receptor 2	1422953_at	-10.8	3.7E-05
<i>Fbln5</i>	Fibulin 5	1416164_at	-11.2	3.1E-05
<i>Slfn12</i>	Schlafen family member 12	1427102_at	-11.5	2.6E-05
<i>Agps</i>	Alkylglycerone phosphate synthase	1454918_at	-13.0	1.3E-05
<i>Aldh1a2</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	1422789_at	-17.1	2.6E-06
<i>Abtb1</i>	Ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1	1417000_at	-19.9	1.0E-06



**ANEXO VI**

**Tabla A5.** Genes incluidos en las 10 redes más significativamente representadas. La tabla muestra las funciones representadas en cada red, la puntuación y los genes diferencialmente expresados presentes en esa red (moléculas clave). Para cada red, los genes sobreexpresados se muestran en **negrita** y los infraexpresados están subrayados.

ID	Funciones principales	Moléculas en la red	Puntuación	Moléculas clave
1	Desarrollo celular, desarrollo y función del sistema hematopoyético y respuesta inmune humoral.	Actin, BCR, <b>BLNK</b> , <u>C3</u> , CCR7, <b>CD40</b> , <b>CD72</b> , <b>CD79A</b> , <b>CD79B</b> , <b>CLIC5</b> , <u>CXCR2</u> , <u>DGAT1</u> , <b>DNTT</b> , <b>EBF1</b> , <b>IGLL1</b> , Igm, <b>IL2RA</b> , Immunoglobulin, <u>MAPK13</u> , <b>MARCKS</b> , <b>MET</b> , NfκB, P38 MAPK, <b>PAFAH1B3</b> , Pi3-kinase, PLC gamma, <b>PNKP</b> , <b>PTPRCAP</b> , <b>RPS3</b> , Shc, <b>SYK</b> , <u>TNFSF13B</u> , VAV, <b>VPREB1</b> , <b>XRCC6</b>	43	25
2	Enfermedades neurológicas, desórdenes genéticos, desórdenes musculoesqueléticos.	AHCY, ANXA1, ATP6V1E1, <u>B4GALT6</u> , <b>C22ORF28</b> , <u>CCDC158</u> , CKB, <u>CNN3</u> , <u>CRABP2</u> , <b>CSRP2</b> , DDX1, ECHS1, EEF2, <u>ESRRA</u> , <u>FBXO7</u> , GLI1, GLRX3, GPI, <u>GRIA3</u> , LDHA, MDH2, NAGK, PDHB, PRDX6, <b>RALGPS2</b> , <b>RPL14</b> , <b>RPL19</b> , <b>RPS3</b> , <b>RPS7</b> , RXRA, <u>SESN3</u> , <u>SLC2A4</u> , TK1, TKT, YWHAZ	21	15
3	Muerte celular, metabolismo de carbohidratos, desórdenes del sistema endocrino.	<b>AFF3</b> , APP, <u>ARHGEF12</u> , <b>BLNK</b> , DUT, EGFR, FLNB, <b>GPAM</b> , GRAP2, GRB2, <b>IRF4</b> , IRS1, KIF5A, <b>KIF5C</b> , LINGO1, <b>LY6D</b> , MAP4K1, NCK, PIK3C2B, PLCG1, PLD2, <b>PLEKHA2</b> , PLXNB1, PPARG, PPFIA4, <b>PTPRK</b> , <b>RAG1</b> , <b>RPTOR</b> , SH2D1A, SH2D1B, SHANK2, <b>SLAMF6</b> , <b>SLAMF7</b> , <u>SORL1</u> , TEC/BTK/ITK/TXK/BMX	19	14
4	Metabolismo lipídico, bioquímica de pequeñas moléculas, ensamblaje y organización celular.	<b>ABLIM1</b> , Alpha tubulin, Beta Tubulin, CD2, CLIP1, <b>CNP</b> , CXCL9, CXCL10, <b>DPP4</b> , DSTN, F Actin, <u>EGD4</u> , <b>FHIT</b> , <b>GHI1</b> , <u>HNRPLL</u> , <u>IRG1</u> , Pak, PFDN1, PFDN2, PFDN4, <b>PFDN5</b> , PFDN6, <u>PLCBL1</u> , Pld, <u>PLD1</u> , PLD2, SNCA, STAT1, STMN1, TBCD, <u>TUBA4A</u> , Tubulin, VBP1, <b>VILI</b> , ZYX	17	13
5	Replicación, recombinación y reparación del ADN, enfermedades hematológicas, cáncer.	ATP5C1, <b>BCAT1</b> , DDX1, DDX17, <b>DNTT</b> , <b>FBLN5</b> , GABPA, <u>GDPD2</u> , <b>IL7R</b> , KCNMA1, <u>KNG1</u> , MYC, <b>NEIL1</b> , PCNA, PDGFRB, PDIA3, PGK1, PLC, POLB, POLD1, POLD2, POLD3, <b>POLD4</b> , <b>RPS7</b> , RPS19, RPS20, <u>RSAD2</u> , SHMT1, <u>SLC12A3</u> , SLC2A1, SNX1, SNX2, <u>SNX15</u> , WRN, <b>XRCC1</b>	15	12
6	Desarrollo celular, muerte celular, desarrollo y función del tejido conectivo.	<b>A130040M12RIK</b> , <u>ALDH1A2</u> , ATF7, <u>ATXN1</u> , CEBPB, COL2A1, <b>CPM</b> , CREB5, CXCL2, EIF4ENIF1, <b>ERO1LB</b> , ERP44, FOS, FOXL2, <u>GCA</u> , HIST1H1C, IL12A, LTBP2, MAFB, MATN2, MKI67, MSR1, <b>MYL4</b> , MYOD1, NFAT, RPS6KA2, <b>SEC63</b> , SMAD7, SOX, <b>SOX4</b> , SOX6, <b>SOX5</b> , <u>TOP1</u> , <u>TXNDC11</u> , XBP1	15	12
7	Señalización celular, enfermedades y condiciones dermatológicas, desórdenes genéticos.	ACT1, <b>B9D2</b> , CARD11, EDAR, <b>EDARADD</b> , <b>FBXW5</b> , <b>HMG20B</b> , <b>IBSP</b> , IRAK, IRAK2, <b>IRAK3</b> , IRAK4, MAP3K7, MAPK14, <u>MAPKAPK3</u> , MAPKAPK2/3, MYD88, NFYB, RBCK1, <b>RHOH</b> , RHOT1, RTKN, <u>TAB3</u> , TGFBR1, <b>TMEM218</b> , TNFRSF17, <b>TNFRSF19</b> , TP73, TP53I11, TRAF1, TRAF3, TRAF3IP2, TRIM30, UBE2V1, <b>WDR34</b>	15	12
8	Hepatomegalia, morfología de los	ACP6, AIMP1, AK2, AMBP, BAT2, <b>BTLA</b> , C2, C19ORF44, C1S, <b>CD93</b> , CNBP, <b>COQ7</b> , CPN1,	14	11

	órganos, expresión génica.	<u>FPR2</u> , HNF1A, HNF4A, HNRNPR, <u>HOOK3</u> , <b>IGF2BP3</b> , IMMT, <u>KNGL1</u> , <u>LIMS1</u> , MAGOH, MRO, MTHFD1, MTPP, NAT10, NRD1, <b>OTUD7B</b> , <u>PPOX</u> , PTPN11, SAA1, TCF7L2, Tnf receptor, <u>USP46</u>		
9	Desórdenes genéticos, enfermedades metabólicas, expresión génica.	ALAS2, <b>ARL5A</b> , CASP9, CBX5, <b>CCM2</b> , <b>CPLX2</b> , <b>FOXP1</b> , <u>GATA1</u> , GP9, HBB, HBE1, HDAC2, Histone h3, HTT, <u>KLF1</u> , <b>2010001M09Rik</b> , <u>MXD1</u> , ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, ND4L, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, <b>NDUFS8</b> , NDUFS6, NDUFV2, PDX1, <u>PLK4</u> , <b>RABGAP1L</b> , SPTB	14	11
10	Desarrollo celular, desarrollo y función del tejido conectivo, expresión génica.	<u>ABTB1</u> , ATF7, <b>BACH2</b> , CREB5, <b>CXXC5</b> , <b>DNAJC7</b> , <u>GPX3</u> , IFI35, <u>2010002M12Rik</u> , IGHM, IRAK2, JUN, MAFB, MAFG, MAFK, NAGK, NFE2L2, <b>PAPPA</b> , <b>PLEKHO1</b> , POU1F1, PSMD8, RANBP9, RUNX2, RUNX3, SIP1, SMAD2, SMAD5, SMAD6, SMAD9, SMURF1, STRAP, <u>TCN2</u> , TOB1, <b>VPREB3</b> , ZNF423	12	10

**ANEXO VII**

**Tabla A6.** Secuencias de los cebadores de la PCR y de los competidores del ensayo de Sequenom

<i>Blnk</i> RIGHT	ACGTTGGATGTAATTCGACGTTTGCAGACC
<i>Blnk</i> LEFT	ACGTTGGATGAGCATACCAGGGCTTACCGA
<i>Blnk</i> EXT	GGCTTTTGCAGACCAGGAGGC
<i>Caps1</i> RIGHT	ACGTTGGATGGTCATCCATAATTCGAAACAC
<i>Caps1</i> LEFT	ACGTTGGATGGAGGTTCTGCAGGCATCAAA
<i>Caps1</i> EXT	TATCCATAATTCGAAACACTCTGCC
<i>CD40</i> RIGHT	ACGTTGGATGGGTTTCTTGACCACCTTTTTG
<i>CD40</i> LEFT	ACGTTGGATGTCCTCATCACCATTTTCGGG
<i>CD40</i> EXT	GTCTTGACCACCTTTTTGATATAG
<i>CD72</i> RIGHT	ACGTTGGATGCAAGGCTCTTGTTCAAGTGTC
<i>CD72</i> LEFT	ACGTTGGATGTCAGGTTTCTGATGGGATC
<i>CD72</i> EXT	TCTCGTTCAAGTGTCGGTTTC
<i>CD79a</i> RIGHT	ACGTTGGATGTGGTACTTACCTCCGCGTGC
<i>CD79a</i> LEFT	ACGTTGGATGTTCCCCATGTCCAGGAAGG
<i>CD79a</i> EXT	CCGCGTGCGCAATCCAG
<i>Cpm</i> RIGHT	ACGTTGGATGTCGTGTCCAGGGACTGTAAC
<i>Cpm</i> LEFT	ACGTTGGATGTAATCTGCTTCTGCTGCC
<i>Cpm</i> EXT	GTCAAGGGACTGTAACATTGATC
<i>Dntt</i> RIGHT	ACGTTGGATGCAAAACTACAGAAAGCCTTG
<i>Dntt</i> LEFT	ACGTTGGATGGATCTCTTCTTCACTTCTGC
<i>Dntt</i> EXT	GAAAGCCTTGAGGGTGT
<i>Dpp4</i> RIGHT	ACGTTGGATGAGCTCTGCTCATGACTGTTG
<i>Dpp4</i> LEFT	ACGTTGGATGCCAATTCAGAGAACAACC
<i>Dpp4</i> EXT	GACTGTTGAGTTCTCTGTA
<i>Gpx3</i> RIGHT	ACGTTGGATGCCACCTGGTCGAACATACT
<i>Gpx3</i> LEFT	ACGTTGGATGAGGCGAGAACTCGGAGATAC
<i>Gpx3</i> EXT	CCTGGTCGAACATACTTGAGAC
<i>IL-7R</i> RIGHT	ACGTTGGATGGGGATTGAAACTACATTGAG
<i>IL-7R</i> LEFT	ACGTTGGATGCTCTGGAACAACATGTAAG
<i>IL-7R</i> EXT	GCACATTCAGACTCGTTTT
<i>Sox4</i> RIGHT	ACGTTGGATGCCGACCCAGTGATCCACT
<i>Sox4</i> LEFT	ACGTTGGATGCATCGGGCGAGCATCCCGG
<i>Sox4</i> EXT	GAAACCAGTGATCCACTGGGGGTACG
<i>Tnfrsf19</i> RIGHT	ACGTTGGATGTCACAAGGTTACCTTGCTG
<i>Tnfrsf19</i> LEFT	ACGTTGGATGTGCGGAGACCCACCTCCTC
<i>Tnfrsf19</i> EXT	GGGTGCTGGTACAGTGTGGT
<b>GENES ENDÓGENOS</b>	
<i>Actb</i> RIGHT	ACGTTGGATGCTCTTTCCAGCCTTCTCTC
<i>Actb</i> LEFT	ACGTTGGATGTGTAGTTTCATGGATGCCAC
<i>Actb</i> EXT	CCCTCCTTCTTCTTGGGTATGG
<i>Gapdh</i> RIGHT	ACGTTGGATGCTTGATGTCATCATACTTGG
<i>Gapdh</i> LEFT	ACGTTGGATGTCCGTCGTGGATCTGACGTG
<i>Gapdh</i> EXT	GTCATCATACTTGGCAGGTT
<i>Hprt1</i> RIGHT	ACGTTGGATGGTTGGATACAGGCCAGACTT
<i>Hprt1</i> LEFT	ACGTTGGATGCCAACAACAACAACTTGTCTGG
<i>Hprt1</i> EXT	AGGGCCAGACTTTGTTGGA
<i>Tubb5</i> RIGHT	ACGTTGGATGGTACTATAATGAAGCCACAG
<i>Tubb5</i> LEFT	ACGTTGGATGAGATCCACCAAGATAGCTCG

<i>Tubb5</i> EXT	GGGCTAATGAAGCCACAGGTGGCA
<b>PRIMERS COMPETIDORES</b>	
<i>Blnk</i>	AGCATACCAGGGCTTACCGAGCAGTTCiGCCTCCTGGTCTGCAAACGTCGAATTA
<i>Capsl</i>	GTCATCCATAATTCGAAACACTCTGCCiAGTCCTTTGATGCCTGCAGAACCTC
<i>CD40</i>	GGTTTCTTGACCACCTTTTGGATATAGiGAAACACCCCGAAAATGGTGATGAGGA
<i>CD72</i>	CAAGGTCTTGTTCaAGTGTCCGTTTcGTTcAGATTGATCCCATCAGGAAACCTGA
<i>CD79a</i>	TTCCCCATGTCCAGGAAGGGCCTAGGGiCTGGATTGCGCACGGGAGGTAAGTACCA
<i>Cpm</i>	TCGTGTCCAGGGACTGTAACATTGATCiCGTAGGACCCGGGCAGCAGAAGCAGATAGTA
<i>Dntt</i>	GATCTCTTCTCACTTTCTGCTTCAAGAiACACCCTCAAGGCTTTCTGTAGTTTTG
<i>Dpp4</i>	AGCTCTGCTCATGACTGTTGAGTTCCTGTATiGGTCAAGGTGTCTTCTGGAATTGGG
<i>Gpx3</i>	CCCACCTGGTCGAACATACTTGAGACaGGGGAGTATCTCCGAGTCTCGCCT
<i>IL-7R</i>	GGGATTGAAACTCACATTCAGACTCGTTTTaGGCTTCTTACATAGTTGTTCCAGAG
<i>Sox4</i>	CATCGGGCAGCATCCCGGGCCTCCATCTaCGTACCCCGAGTGGATCACTGGGGTCGG
<i>Tnfrsf19</i>	TCACAAGGTTACCTTGCTGGTACAGTGTGGTaCGTAGGGAGGAGGTGGGTCTCCGCA
<b>GENES ENDÓGENOS</b>	
<i>Actb</i>	TGTAGTTTCATGGATGCCACAGGAATaCCATACCCAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG
<i>Gapdh</i>	CTTGATGTCATCATACTTGGCAGGTTaCTCCAGGCGGCACGTCAGATCCACGACGGGA
<i>Hprt1</i>	CCAACAACAACCTTGTCTGGAATTTCAATCCAACAAGGCTGGCCTGTATCCAAC
<i>Tubb5</i>	AGATCCACCAAGATAGCTCGAGGGACATACaTGCCACCTGTGGCTTCATTATAGTAC

**ANEXO VIII.****Tabla A7.** Características antropométricas y densitométricas de la población en el estudio de análisis de la expresión diferencial de las células B de MO tras la OVX.

	<b>Número</b>	<b>Valor</b>
Edad (años)	895	55.5±8.6
Años desde la menopausia	895	7.0±6.5
Peso (kg)	895	66.3±11.2
Altura (cm)	895	157.3±6.3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	895	26.9±4.5
Usuaría Terapia Hormonal (%)	895	27.8
DMO CF (g/cm <sup>2</sup> )	888	0.791±0.121
CF Valor T	888	-1.044±1.036
CF Valor Z	888	-0.110±0.950
DMO CL (g/cm <sup>2</sup> )	868	0.987±0.151
CL Valor T	868	-1.223±1.365
CL Valor Z	868	-0.175±1.220