

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA
ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**

**RICARDO USATEGUI MARTIN
2016**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA
ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**

**RICARDO USATEGUI MARTIN
2016**

DIRECTORES:

**PROF. DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO
PROF. DR. JAVIER DEL PINO MONTES**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



El Prof. Dr. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, Catedrático del Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca.

El Prof. Dr. JAVIER DEL PINO MONTES, Profesor Titular del Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “ESTUDIO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET”, que presenta el Licenciado en Bioquímica Don Ricardo Usategui Martín, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios, para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al **Grado de Doctor** por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el presente certificado.

En Salamanca, a 28 de Enero de 2016.

Dr. Rogelio González Sarmiento

Dr. Javier Del Pino Montes

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/01741) y por la Junta de Castilla y León (GRS 969/A/14).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a cada uno de los Pacientes que han participado en este estudio el haberse servido tan voluntariosos en todo momento. Me haría muy feliz que esta Tesis algún día “os ” sirva para mejoraros la vida (*“no existen enfermedades, sino Enfermos”*).

En segundo lugar, a mis directores. Al Dr. Rogelio González Sarmiento, por su dirección, su tutela, por guiarme en esta bella Profesión...en definitiva, por ser mi Maestro. Al Dr. Javier Del Pino Montes por ser el complemento perfecto en la dirección de mis “movimientos” . Ambos sois un ejemplo en la lucha por ayudar al prójimo. Es un placer y un orgullo ser vuestro discípulo.

En tercer lugar agradecer a todos mis compañeros de trabajo el haber estado ahí, sois la mejor ayuda, sin vosotros el día a día sería muchísimo más complicado, por no decir imposible. A alguno ya hace tiempo que os veo como grandes amigos; habéis pasado de compañero de clase, de compañero(s) de laboratorio(s), de residente(s)...; a formar parte de mis mejores amigos.

Y para terminar, agradecer a toda esa gente que estáis ahí siempre, hacéis lo mas difícil del mundo: ayudar día a día sin ser conscientes de ello...no sois otros que, mis Padres, mis Hermanos, Vero, mi Primo, mi casi Primo, mis amigos...en definitiva mi gran Familia, la mejor.

-A TODOS, MUCHAS GRACIAS DE CORAZÓN-

A MIS PADRES.
El mejor ejemplo a seguir.
Cada día lucho por parecerme
un poco más a vosotros

ÍNDICES



ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICES	1
ÍNDICE DE CAPÍTULOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE VIDEOS	8
INTRODUCCIÓN	9
1-ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	11
1.1-RESEÑA HISTÓRICA	11
1.2-EPIDEMIOLOGÍA	11
1.3-CLÍNICA	12
1.4-DIAGNÓSTICO	13
1.5-TRATAMIENTO	14
1.6-PATOGENIA	15
1.6.1-FISIOPATOLOGÍA DEL REMODELADO ÓSEO	15
1.6.2-FISIOPATOLOGÍA DE LOS OSTEOCLASTOS	16
1.7-ETIOLOGÍA	18
1.7.1-FACTORES AMBIENTALES	18
1.7.2-TEORÍA GENÉTICA	18
1.7.3-MODELO INTEGRADO	19
2-GEN DEL SEQUESTOSOMA1. ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	19
2.1- GEN DEL SEQUESTOSOMA1 (SQSTM1) Y PROTEÍNA P62	20
2.2- FUNCIONES DE LA PROTEÍNA P62	20
2.2.1- DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DEL PROTEOSOMA	21
2.2.2- APOPTOSIS	21
2.2.3- AUTOFAGIA	21
2.2.4- SUPERVIVENCIA CELULAR	22
2.3- PROTEÍNA P62 Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	24
3-AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	25
3.1 -AUTOFAGIA	25
3.2 -AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	27
4-LONGITUD TELOMÉRICA Y METABOLISMO ÓSEO	27
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	31
PACIENTES Y MÉTODOS	35
1- PACIENTES Y CONTROLES	37
1.1-DEFINICIONES	37
1.2-RECOGIDA DE DATOS	38
2- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
2.1 -AISLAMIENTO DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.	39
2.2 -AISLAMIENTO DE RNA Y SÍNTESIS DEL cDNA DEL GEN SQSTM1.	40
3- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	42
3.1- ESTUDIO DE DELECCIONES MEDIANTE PCR MULTIPLEX	42

3.2 -DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR-RFLP	43
3.3 -DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN	43
4- ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA	44
5- ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1	46
5.1 -AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR	46
5.2 -ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	47
5.3 -PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR CON EXONUCLEASAS	48
5.4 -SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA	48
6- ESTUDIO POBLACIONAL MEDIANTE DHPLC	48
7- ESTUDIOS “<i>IN-SILICO</i>” DE LA PATOGENICIDAD DE MUTACIONES	49
8- CLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN	49
8.1- CLONACIÓN EN EL VECTOR pGEM-T ® EASY	49
8.2- PREPARACIÓN DE CÉLULAS SUPERCOMPETENTES	50
8.3- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS SUPERCOMPETENTES	50
8.4- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE COLONIAS TRANSFORMADAS	50
8.5- CLONACIÓN EN EL VECTOR pCEFL-FLAG	51
9- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	52
9.1 -PCR	52
9.2 -DIGESTIÓN DE LA HEBRA PARENTAL CON LA ENZIMA DpNI	53
9.3 -TRANSFORMACIÓN EN LAS BACTERIAS SUPERCOMPETENTES XL-1 BLUE	53
10- CULTIVOS CELULARES	54
10.1- LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO	54
10.2 -EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR	54
10.3 -CONTAJE DE CÉLULAS	54
11- TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	55
12- MICROSCOPIA CONFOCAL E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	55
13- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT	56
14- INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	56
15- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
16- GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	58
16.1- GENERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA RECOMBINANTE PARA LA CREACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO	58
16.2- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES	59
16.3- IMPLANTACIÓN DE LOS EMBRIONES Y GESTACIÓN	59
16.4- IDENTIFICACIÓN DE LOS NUEVOS RATONES TRANSGÉNICOS	60
16.5- ESTABULACIÓN Y GENERACIÓN DE LA NUEVA COLONIA	60

RESULTADOS	61
1-ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	63
2-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	66
2.1-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA DETOXIFICACIÓN CELULAR: GSTM1, GSTT1 Y GSTP1	66
2.2-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DEL OSTEOCLASTO: VAV3	67
2.3-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA AUTOFAGIA: ATG2B, ATG5, ATG10 Y ATG16L1	70
3-ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET. ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	73
4-CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	76
4.1 -MUTACIÓN P.E274D.	76
4.2 -MUTACIÓN P.A426V	78
4.3 -MUTACIÓN P.R321C	79
5- ESTUDIO DE UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	83
DISCUSIÓN	85
1- ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	87
2- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	88
2.1-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA DETOXIFICACIÓN CELULAR: GSTM1, GSTP1 Y GSTT1	88
2.2-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DEL OSTEOCLASTO: VAV3	89
2.3-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN AUTOFAGIA: ATG2B, ATG5, ATG10 Y ATG16L1	90
3- ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET. ASOCIACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO.	92
4- CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	95
4.1- MUTACIÓN P.E274D	96
4.2 -MUTACIÓN P.A426V	97
4.3 -MUTACIÓN P.R321C	97
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Radiografías simples de pacientes con EOP. Radiografía de cadera (A), húmero (B y C), columna lumbar (D) y pelvis (E). La calota de un paciente con EOP comparada con la de un individuo sin EOP (F) ²⁸ .	14
Figura 2. Imágenes histológicas de la cresta iliaca de un paciente con EOP. Se aprecia un hueso aumentado de tamaño, inmaduro y no laminar (A-D). En el frente de resorción se produce un aumento del número, tamaño y actividad de los osteoclastos (A-B). Mediante la tinción de Von Kossa-Van Gieson se aprecia un aumento del grosor de la matriz osteoide (C). Usando luz polarizada se aprecia la desorganización ósea (D) ²⁸ .	15
Figura 3. Representación esquemática del origen de los osteoclastos ³⁷ .	16
Figura 4. Representación gráfica de los dominios de la proteína p62 ⁷⁰ .	20
Figura 5. Implicación de la proteína p62 en el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas mediante el proceso de autofagia. La proteína p62 crea dímeros que unen y ubiquitinizan a las proteínas que serán eliminadas; los agregados de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma mediante la interacción entre la proteína p62 y la proteína LC3 ⁸³ .	22
Figura 6. Cascada de señalización necesaria para el control de la ruta NF-kB mediada por la interacción RANK-RANKL ⁷⁷	23
Figura 7. Bajo circunstancias normales la proteína p62 (a través de su dominio UBA) ubiquitina a la proteína CYLD, produciéndose el freno de la osteoclastogénesis (A). En los pacientes portadores de mutaciones en el dominio UBA de la proteína p62 no son capaces de activar a la proteína CYLD, produciéndose un desacoplamiento en la osteoclastogénesis, causando el desarrollo de la EOP (B) ¹⁰⁵	24
Figura 8. Etapas y mecanismo molecular del proceso de autofagia ¹¹⁰	26
Figura 9. Ruta de formación del complejo Atg5-Atg21-Atg16L1 y de conjugación de LC3-I con PE. Atg7 actúa como una ligasa E1, mientras que Atg10 y Atg3 lo hacen como ligasas de tipo E2 ¹⁰⁹	26
Figura 10. Estructura del extremo telomérico linearizado (A) y del extremo telomérico formando el D-loop y el T-loop (B) junto a sus proteínas asociadas ¹²⁵	28
Figura 11. Estructura del complejo de la telomerasa ¹²⁶	29
Figura 12. Ejemplo de resultados obtenidos en el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1	42
Figura 13. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan del polimorfismo rs7528153 del gen VAV3. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos AA, los verdes son heterocigotos AT y los rojos son homocigotos TT.	44
Figura 14. Representación del vector de clonación pGEM-T Easy	50
Figura 15. Representación del vector de clonación pCEFL-Flag	51
Figura 16. Representación de la construcción pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D (A) y de la construcción pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C (B).	52
Figura 17. Detalle de los cuadrantes de la cámara Neubauer	54

Figura 18. Representación de la construcción p.CAGGS/cDNA SQSTM1.321C.	58
Figura 19. Árbol genealógico de la familia 6.	74
Figura 20. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.E274D.	77
Figura 21. Ensayo de inmunofluorescencia en células COS1 WT y células COS1 E274D.	77
Figura 22. Expresión de las proteínas p62 y NF-kB en células COS1 WT y en células COS1 274D	78
Figura 23. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.A426V.	78
Figura 24. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.R321C.	79
Figura 25. Ensayo de inmunofluorescencia en células COS1 WT y en células COS1 321C.	80
Figura 26. Ensayo de co-inmunofluorescencia de las proteínas p62 y LC3 en células COS1 321C y en células COS1 WT (A). Ensayo de co-inmunofluorescencia de las proteínas p62 y Lamp1 en células COS1 321C y en células COS1 WT (B)	81
Figura 27. Ensayo de co-inmunoprecipitación en células COS1 321C, en células COS1 WT y en células COS1 sin transfectar. A) Inmunoprecipitación con un anticuerpo primario anti Flag-p62 y detección mediante Western Blot con un anticuerpo primario anti LC3. B) Inmunoprecipitación con un anticuerpo primario anti LC3 y detección mediante Western Blot con un anticuerpo primario anti Flag-p62.	82
Figura 28. Expresión de la proteína p62 en células COS1 WT, en células COS1 321C y en células COS1 sin transfectar.	82
Figura 29. Comparación de la proliferación celular entre células COS1 sin transfectar, células COS1 WT y células COS1 321C	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice anatómico de Renier ¹⁴²	39
Tabla 2. Condiciones empleadas para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1.	42
Tabla 3. Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo Ile105Val del gen GSTP1	43
Tabla 4. Polimorfismos estudiados mediante discriminación alélica con sondas TaqMan	44
Tabla 5. Secuencia de los cebadores necesarios para amplificar los ocho exones del gen SQSTM1	46
Tabla 6. Condiciones de amplificación para los ocho exones del gen SQSTM1.	47
Tabla 7. Temperatura de desnaturalización para las mutaciones p.E274D, p.R321C y p.A426V.	49
Tabla 8. Secuencia de los cebadores necesarios para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de las mutaciones p.E274D y p.R321C.	53
Tabla 9. Relación de los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia en este trabajo	55
Tabla 10. Relación de anticuerpos utilizados para Western Blot en este trabajo	56

Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación en este trabajo	57
Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con EOP utilizados en el estudio de la longitud telomérica	63
Tabla 13. Media de la longitud telomérica de cada uno de los grupos estudiados y el p-valor resultante de cada una de las comparaciones entre pacientes y controles	64
Tabla 14. Frecuencia genotípica de los polimorfismos TERT rs2735940 y TERC rs2293607 entre pacientes con EOP y controles	65
Tabla 15. Características clínicas de los pacientes utilizados en el estudio de asociación de polimorfismos de genes implicados en detoxificación celular: GSTM1, GSTT1 y GSTP1.	66
Tabla 16. Distribución de los genotipos estudiados en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 y su asociación con el riesgo a desarrollar EOP.	67
Tabla 17. Características clínicas de los pacientes con EOP utilizados en el estudio de asociación del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153.	68
Tabla 18. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo VAV3 rs7528153.	68
Tabla 19. Distribución genotípica y alélica entre pacientes de carácter esporádico y pacientes de carácter familiar en el estudio del polimorfismo VAV3 rs7528153.	69
Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo VAV3 rs7528253 en el grupo de pacientes en función de su historia familiar.	69
Tabla 21. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo VAV3 rs7528253 en el grupo de pacientes en función del número de huesos afectados.	70
Tabla 22. Distribución genotípica entre pacientes y controles en el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214	71
Tabla 23. Distribución de las frecuencias alélicas entre pacientes y controles de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214.	72
Tabla 24. Distribución alélica entre pacientes y controles resultado del estudio conjunto de los polimorfismos ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214.	72
Tabla 25. Características clínicas de los pacientes con EOP incluidos en el estudio molecular del gen SQSTM1.	73
Tabla 26. Características clínicas de los pacientes portadores de mutación en el gen SQSTM1.	75
Tabla 27. Análisis de las características clínicas de los pacientes con EOP en función del estudio molecular del gen SQSTM1.	76

ÍNDICE DE VIDEOS

Video 1. Comportamiento del ratón transgénico que sobre-expresa la variante de la proteína p62 p.321C	83
--	----

INTRODUCCIÓN



1- ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

La Enfermedad Ósea de Paget (EOP) es un trastorno focal del hueso que afecta de modo segmentario al esqueleto. Se caracteriza por un aumento del recambio óseo de forma desorganizada: se produce un gran incremento de la resorción ósea seguida de una formación de hueso en la misma proporción; como resultado se produce un tejido óseo inmaduro, no laminar, muy vascularizado, aumentado de volumen y con sus propiedades mecánicas alteradas^{1,2}. La EOP es la enfermedad metabólica ósea más frecuente tras la osteoporosis³.

1.1 RESEÑA HISTÓRICA.

En 1876, Sir James Paget publicó el caso clínico de un varón afecto de lo que denominó “osteitis deformans”. El paciente había acudido a su consulta por deformidad en la tibia izquierda cuando tenía 46 años. Durante los 22 años en los que fue atendido por el Dr. Paget desarrolló deformidad craneal, sordera y, finalmente, un osteosarcoma en el radio izquierdo a causa del cual falleció a los 68 años⁴. Años después, Paget presentó nuevos casos describiendo la entidad como una enfermedad que *“comienza en la edad media de la vida o después y afecta con más frecuencia a los huesos largos de las extremidades inferiores, la pelvis y el cráneo. Los huesos se agrandan y se hacen más maleables, y aquellos que soportan peso llegan a curvarse de forma antinatural”*⁵.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente, la EOP es la enfermedad metabólica ósea más frecuente tras la osteoporosis³. Suele diagnosticarse por encima de los 55 años y es rara por debajo de los 40. Hay un ligero predominio de los varones frente a las mujeres⁶.

La prevalencia y distribución geográfica de la EOP son muy variadas. Ha sido descrita en casi todos los lugares del planeta, pero el número de casos varía enormemente entre diferentes zonas³. Así, la enfermedad es frecuente en Inglaterra (entorno al 4%)⁷, áreas de Australia, Nueva Zelanda⁸ o Norteamérica⁹ y rara en África (menos del 1%)¹⁰, Asia o la península escandinava¹¹. En Europa, la prevalencia desciende según pasamos del Norte al Sur, a excepción de la península Escandinava. De este modo, en Holanda hay una prevalencia del 3,6 %¹², en Francia del 2% y en Italia del 0,5%¹³.

La prevalencia en España se sitúa entorno al 1,2% de la población mayor de 55 años. Resultados previos de nuestro grupo de investigación demuestran que la prevalencia en la provincia de Salamanca es del 1,7%^{14,15}.

Además de la peculiar distribución de la enfermedad entre los diferentes países, dentro de cada uno de ellos existen diferencias marcadas entre regiones vecinas, apareciendo focos de alta prevalencia: zonas en las cuales se produce una acumulación significativa de casos. El foco más conocido es el de Lancashire (Inglaterra) con una prevalencia en la población mayor de 55 años del 7%, frente al 4,5% del conjunto de Inglaterra ¹⁶. En nuestro país son dos los principales focos de alta prevalencia descritos: Sierra de la Cabrera (Madrid) con una prevalencia del 6,4% ¹⁷ y la Comarca de Vitigudino (Salamanca) con una prevalencia del 5,7% ¹⁵.

1.3 CLÍNICA

La EOP es una enfermedad crónica que en la mayoría de los casos se diagnostica en pacientes adultos mayores de 55 años. La relación hombre-mujer es cercana a la unidad, con un ligero predominio de los varones (50,9%) ⁶.

Las manifestaciones clínicas propias de la EOP son el dolor y la deformidad ósea. La enfermedad tiene una larga fase asintomática y hasta un 70% de los pacientes con EOP no refieren ningún tipo de sintomatología a lo largo de la evolución ¹⁸.

En el 25 % de los casos la enfermedad se presenta de forma monostótica (afectación de un solo hueso), mientras que en el 75% de los pacientes aparece de forma poliostótica (afectación de varios huesos), generalmente no contiguos ¹⁹. Las principales localizaciones afectadas son la pelvis (58-80%), la columna (40%), el fémur (32%), el cráneo (20-30%) y la tibia (16-20%). En un segundo nivel se encuentran la escápula (5%), la clavícula (4%), las costillas (4%) y los huesos de la cara. Los huesos de los pies (2%) y los de las manos (< 1%) rara vez se ven envueltos. Durante su evolución no suelen aparecer lesiones distintas a las diagnosticadas inicialmente ^{6,19,20}.

El dolor es el síntoma más frecuente. El dolor de origen óseo se describe como sordo, profundo, poco localizable, de predominio nocturno y que aumenta con la carga. Suele coincidir con un aumento de la actividad de la enfermedad. Se atribuye a la deformidad perióstica, al aumento de la vascularización y a las microfracturas. ^{21,22}.

Las deformidades esqueléticas son más evidentes en los huesos largos, el cráneo y la clavícula. Los huesos largos se curvan por el peso del paciente debido al aumento del volumen y la maleabilidad de los huesos afectos. El crecimiento del tamaño y las deformidades craneofaciales pueden transformar la fisonomía del paciente ¹⁹.

Se han descrito diversas complicaciones asociadas al desarrollo de EOP :

- Artropatía secundaria por vecindad. La coxopatía y la artropatía de rodilla son las más frecuentes ²³.
- Fracturas patológicas o traumáticas ²³.

- Complicaciones neurológicas debido a compresión de estructuras neurológicas (secundaria al crecimiento óseo) o a insuficiencia vascular (debido a hipervascularización ósea). La sordera, de predominio neurosensorial, es muy frecuente cuando se afecta el hueso temporal del cráneo. Más raramente pueden encontrarse alteraciones visuales, neuralgia del trigémino o parálisis facial por la compresión de otros pares craneales ^{23,24}.
- Afectación bucodental produciéndose maloclusión e hipercementosis ²³.
- Complicaciones cardiovasculares debido al “robo” parcial del volumen sanguíneo circulante por aumento de la red vascular en las zonas afectas ²³.
- Trastornos metabólicos, principalmente alteraciones del metabolismo del fósforo y del calcio debido a la gran actividad ósea que sufren estos pacientes ²³.
- Transformación tumoral del hueso pagético, especialmente a osteosarcoma; es una complicación rara que aparece en menos del 0,5% de los pacientes ^{25,26}.

1.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la Enfermedad Ósea de Paget es casual en el 75% de los casos; bien sea por el hallazgo de niveles elevados de fosfatasa alcalina (FA) no explicados por otras patologías, o bien por la presencia de cambios radiológicos sugerentes de EOP en estudios practicados por otros problemas médicos ²⁰.

Cuando el paciente es sintomático el diagnóstico de EOP es apoyado por:

- Marcadores de recambio óseo (MRO). La elevación de los MRO refleja modificaciones en el metabolismo óseo. La FA total y la isoenzima ósea de la FA (marcadores de la formación ósea), el fragmento amino-terminal del propéptido del colágeno I (PINP) y el telopéptido amino-terminal (marcadores de resorción ósea), se encuentran elevados en las fases de actividad metabólica de forma proporcional, lo que da idea del acoplamiento entre los procesos de formación y resorción. El resto de los parámetros metabólicos óseos son normales ¹⁹.
- Radiografía simple. La radiología simple suele ser la base del diagnóstico. La lesión no suele afectar al hueso en toda su extensión, y el límite entre las zonas sana y enferma aparece como una imagen lítica (“en forma de V” en la diáfisis de los huesos largos) (Figura 1) ²⁷.
- Gammagrafía ósea. La gammagrafía ósea con bifosfonato (BSF) marcado con tecnecio-99 ofrece imágenes de aumento de captación (3-5 veces la del hueso normal) en las zonas de incremento de la vascularización y actividad osteoblástica. Aunque poco específica, tiene una gran sensibilidad para detectar lesiones, incluso las muy precoces aún no visibles en la radiografía ²⁷.
- Biopsia. Es útil para el diagnóstico diferencial con los tumores ²⁸.

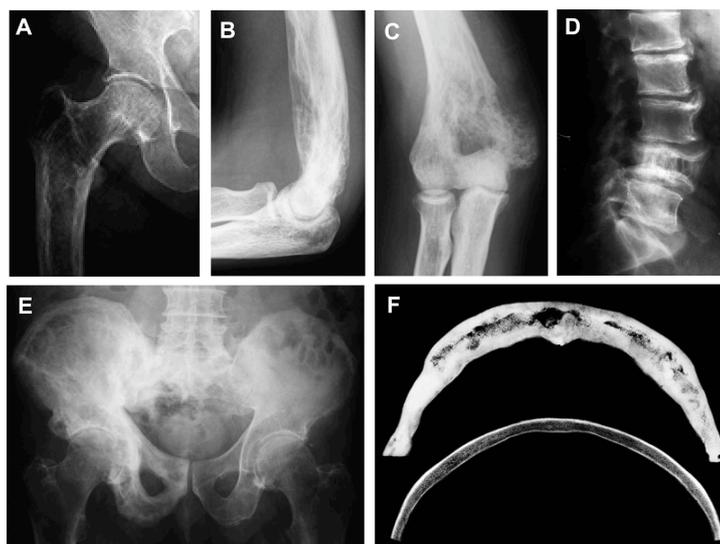


Figura 1. Radiografías simples de pacientes con EOP. Radiografía de cadera (A), húmero (B y C), columna lumbar (D) y pelvis (E). La calota de un paciente con EOP comparada con la de un individuo sin EOP (F) ²⁸.

1.5 TRATAMIENTO

Los objetivos terapéuticos de la Enfermedad Ósea de Paget son limitar la progresión y las complicaciones, además de controlar las manifestaciones clínicas. El tratamiento está recomendado en aquellos pacientes sintomáticos o en pacientes asintomáticos con enfermedad biológicamente activa ^{29,30}.

La calcitonina fue durante muchos años el único tratamiento para la EOP; en la actualidad, los bifosfonatos son el tratamiento de elección. Los bifosfonatos son análogos potentes de los pirofosfatos inorgánicos, los cuales tienen gran afinidad por el fosfato cálcico; los no nitrogenados (etidronato, clodronato o tiludronato) son menos potentes que los nitrogenados (pamidronato, risedronato, alendronato o zoledronato), por lo que se utilizan poco en la actualidad. Los osteoclastos metabolizan los bifosfonatos no nitrogenados dando lugar a la formación intracelular de metabolitos de ATP que inhiben los osteoclastos y favorecen su apoptosis. Además, los bifosfonatos no nitrogenados alteran la superficie del hueso, que se vuelve tóxica para los osteoclastos. Los nitrogenados bloquean la enzima farnesil pirofosfato sintetasa de la vía del mevalonato, que está relacionada con la síntesis del colesterol. Esta inhibición evita la prenilación de las proteínas e induce cambios en el citoesqueleto de los osteoclastos, condicionando su apoptosis ³¹.

En caso de fractura, deformidad o artropatía pagética puede estar indicada la cirugía y/o rehabilitación ³².

1.6 PATOGENIA

En la EOP se produce un aumento en el número, actividad y tamaño de los osteoclastos, lo que produce que el recambio óseo esté acelerado dando lugar a un aumento desmesurado de la resorción ósea que va seguido de una rápida formación ósea “compensadora” de la misma intensidad. Como resultado, se produce la formación de un hueso inmaduro, desorganizado, no laminar y con numerosas líneas de cementación “en mosaico” que altera el tejido cortical con secciones irregulares de patrón trabecular. La mineralización de la matriz ósea es normal. Las localizaciones afectadas están aumentadas de tamaño, son esclerosas, menos compactas, más vascularizadas y susceptibles a fractura y/o deformación (figura 2). Con el paso del tiempo, la hiper celularidad va disminuyendo, quedando únicamente hueso escleroso, sin evidencia de metabolismo óseo activo; a esta última fase se la denomina Paget “quemado” o “agotado”. En la evolución de la lesión ósea se distinguen tres etapas: la osteolítica con predominio osteoclástico, la mixta, en la que coinciden lesiones líticas y escleróticas, y la tercera fase con predominio de la esclerosis. Las etapas evolutivas de la enfermedad pueden verse al mismo tiempo en distintas zonas enfermas de un mismo sujeto ²⁸.

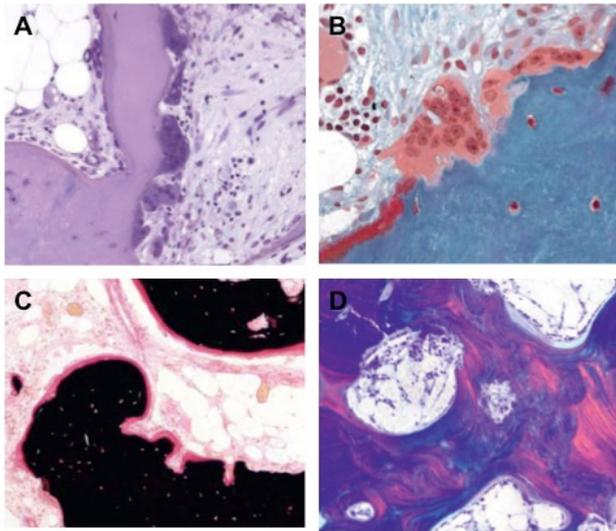


Figura 2. Imágenes histológicas de la cresta iliaca de un paciente con EOP. Se aprecia un hueso aumentado de tamaño, inmaduro y no laminar (A-D). En el frente de resorción se produce un aumento del número, tamaño y actividad de los osteoclastos (A-B). Mediante la tinción de Von Kossa-Van Gieson se aprecia un aumento del grosor de la matriz osteoide (C). Usando luz polarizada se aprecia la desorganización ósea (D) ²⁸.

1.6.1 Fisiopatología del remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico en el que existe un equilibrio entre la resorción (destrucción de hueso) y absorción ósea (formación de hueso), fenómeno denominado “acoplamiento óseo”. El hueso está sometido a un continuo proceso de renovación y reparación, denominado “remodelado óseo”. Este recambio ocurre a la vez en distintas regiones del esqueleto, presentando diferentes grados de actividad y desarrollo en cada una de ellas ³³⁻³⁵.

Durante el ciclo de remodelado óseo, el hueso viejo o dañado es eliminado por los osteoclastos, que secretan ácidos y enzimas proteolíticas en la superficie del hueso. Posteriormente, los osteoclastos migran fuera del frente de resorción y se eliminan por apoptosis. Los osteoblastos (procedentes de células mesenquimales) son los encargados de establecer una nueva matriz ósea en forma de matriz osteoide no mineralizada. Más tarde, el osteoide se calcifica para formar el hueso maduro. Durante la formación del hueso algunos osteoblastos quedan incrustados en la matriz ósea y se diferencian a osteocitos. El proceso de resorción dura de diez a catorce días y el consiguiente proceso de formación de hueso dura unos tres meses³³⁻³⁵.

Tanto el remodelado como acoplamiento óseo están regulados por factores sistémicos como son parathormona (PTH), vitamina D, hormonas sexuales y calcitonina; y por factores locales como el óxido nítrico, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas³⁵.

1.6.2 Fisiopatología de los osteoclastos

Los osteoclastos son células macrofágicas, multinucleadas y altamente especializadas. Los osteoclastos son las únicas células capaces de hidrolizar la matriz del hueso, tanto la parte inorgánica (hidroxiapatita), como la orgánica (colágeno y otras proteínas)³⁶.

Los osteoclastos derivan de la fusión de precursores mononucleares de la estirpe granulomonocítica (CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias Gránulo Monocíticas), que derivan a su vez de células madre hematopoyéticas (CFU-S: Unidades Formadoras de Colonias Esplénicas)³⁶. Para que se complete la osteoclastogénesis es necesario que el precursor hematopoyético interactúe con precursores osteoblásticos o células estromales, que expresan RANKL (*receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*) y CSF-M (factor estimulador de colonias de macrófagos). La presencia conjunta de ambos factores es necesaria y suficiente para la maduración del precursor osteoclástico mediante la expresión de los genes que caracterizan su estado de madurez: TRAP (fosfatasa ácida resistente al tartrato), CATK (catepsina K) y CTR (receptores de calcitonina) y β_3 integrina (Figura 3)^{36,37}.

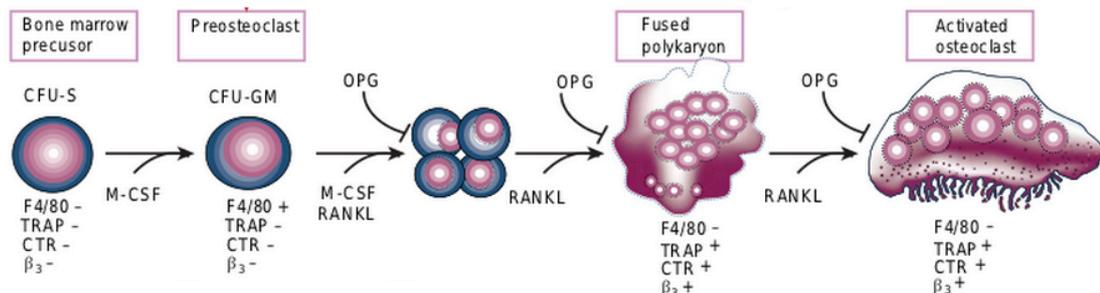


Figura 3. Representación esquemática del origen de los osteoclastos³⁷.

RANK (*receptor activator of nuclear factor-kappa B*) es un receptor transmembrana que se expresa en la superficie de los osteoclastos y sus precursores. Es miembro de la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La interacción RANK-RANKL inicia la diferenciación de los osteoclastos y favorece su supervivencia mediante activación de la ruta NF- κ B. Además de la estimulación del precursor del osteoclasto mediante la fracción de RANKL soluble (producido por osteocitos, células T, osteoblastos y células estromales de la médula), en la fase inicial de la osteoclastogénesis existe una interacción con RANKL unido a membrana, de forma que es necesario un contacto intercelular entre el osteoblasto y el precursor del osteoclasto³⁸.

La osteoprotegerina (OPG), un tercer miembro de la familia de los receptores del TNF, también interviene en la osteoclastogénesis. La OPG es un receptor proteico soluble que compete con el RANK en su unión con el RANKL. La relación entre los niveles de OPG y RANKL es crítica para la regulación de la actividad de los osteoclastos, controlando la activación del RANK en ellos. La OPG es secretada por los osteoblastos y las células estromales y sus niveles están regulados por múltiples factores sistémicos y locales³⁹.

La activación del osteoclasto se desarrolla en respuesta a la unión entre RANK y su ligando (RANKL). Esta unión da lugar a la polarización de la célula, induciendo una alteración en su citoesqueleto y la formación de “uniones fuertes” (*tight junction*) que rodean la zona entre el hueso y la membrana, la cual se pliega múltiples veces para formar el borde rugoso del osteoclastos⁴⁰. Esta zona de la membrana contiene un alto número de vacuolas cargadas de ATPasas, bombas de protones y lisosomas que contienen enzimas proteolíticas ácidas. Una vez activado el osteoclasto, se inicia el proceso de resorción de la matriz ósea. Esta fase es principalmente extracelular. Al espacio que se establece entre el osteoclasto y el hueso se le denomina laguna de resorción o de *Howship* y permanece sellado por las “uniones fuertes”. En esta laguna la célula segrega tanto protones, para disolver los componentes inorgánicos, como enzimas proteolíticas para deshacer los orgánicos. Los restos degradados de la matriz ósea son incorporados por endocitosis por los osteoclastos y transportados al borde opuesto de la célula, región denominada *dominio secretorio funcional*, donde son liberados a la circulación⁴¹. Este proceso de transcitosis permite al osteoclasto permanecer en movimiento mientras continua degradando matriz ósea sin necesidad de eliminar la zona de aislamiento que está permanentemente reorganizándose⁴².

La familia Rho de las GTPasas es fundamental para el remodelado del citoesqueleto de actina en muchos tipos celulares y, como tal, interviene de forma decisiva en la resorción ósea llevada a cabo por los osteoclastos⁴³. Las Rho GTPasas actúan como “interruptores moleculares”, ciclando entre un estado activo (unidas a GTP) y un estado inactivo (unidas a GDP). El control de este ciclo está controlado por tres clases de proteínas reguladoras: GEFs (Factor de intercambio de nucleótidos de guanina), GAPs

(Proteína activadora de la GTPasa) y GDIs (Inhibidor de la disociación del GDP). Las proteínas Vav constituyen la familia de Rho GTPasas mejor caracterizadas en mamíferos. Hasta el momento son tres las proteínas pertenecientes a la familia Vav: Vav1, Vav2 y Vav3⁴⁴⁻⁴⁶. Faccio *et al.* describieron en el año 2005 el papel fundamental que lleva a cabo la proteína Vav3 en la función osteoclástica: que es crucial en la polarización del osteoclasto necesaria para el inicio de la actividad resortiva. Ratones VAV3^{-/-} desarrollan patología ósea debido a que se produce un desacoplamiento entre la resorción y la formación de hueso⁴⁷.

La activación del osteoclasto cesa con su muerte por apoptosis⁴⁸.

Tanto el proceso de osteoclastogénesis como la activación de los osteoclastos está altamente regulado tanto por factores locales como por factores sistémicos. Como factores locales cabe destacar la acción de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL6), interleucina 4 (IL4), interleucina 18 (IL18), interferón β , factor transformante β (TGF β), y el factor de necrosis tumoral (TNF). Entre los factores sistémicos que ejercen un control sobre la osteoclastogénesis y activación de los osteoclastos destaca la acción de la PTH, la vitamina D, la calcitonina, los estrógenos y andrógenos, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas^{35,37,42}.

1.7 ETIOLOGÍA

A lo largo de los años se han expuesto múltiples hipótesis para tratar de explicar el origen de la EOP. Aunque las causas no son bien conocidas y existen algunas controversias, se considera a la EOP una enfermedad multifactorial en la que participan factores ambientales y genéticos⁴⁹.

1.7.1 Factores ambientales

Algunos datos epidemiológicos, como su distribución heterogénea o los cambios más recientes de su incidencia y gravedad apoyan la participación de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito su asociación con dietas pobres en calcio y vitamina D durante la infancia^{50,51}, exposición a toxinas ambientales⁵², contacto con animales durante la infancia⁵³⁻⁵⁵, consumo de carne no controlada⁵⁶, consumo de agua no tratada¹⁵ y con agentes infecciosos como los virus (*paramixoviridae*)^{55,57,58}.

1.7.2 Teoría genética

Desde que en 1904 se publicara el primer caso familiar de EOP hay múltiples evidencias de que alteraciones genéticas juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Hay una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%), con un riesgo

relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre los familiares de pacientes con EOP. En la mayor parte de las familias, la herencia tiene un patrón autosómico dominante con una alta penetrancia en la sexta década ^{59,60}.

El gen candidato más plausible es el Sequestosoma1 (SQSTM1), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), que codifica a la proteína p62. Variaciones en la proteína p62 causarían un desacoplamiento en la actividad de los osteoclastos, base patogénica del desarrollo de la EOP. Se ha descrito que entre el 20-40% de los pacientes con antecedentes familiares y entre el 5-10% de los pacientes con enfermedad esporádica son portadores de mutaciones en el gen SQSTM1 ^{61,62}.

Otros genes candidatos para EOP son los genes CSF-1 que codifica el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF); TNSRSF11A, que codifica el receptor activador del factor nuclear Kappa β (RANK); OPTN que codifica la optineurina (OPN) y TM7SF4 que codifica la proteína transmembrana específica de célula dendrítica (DC-STAMP) ⁶³.

1.7.3 Modelo integrado

Ni los factores ambientales ni los genéticos explican por separado la etiopatogenia de la EOP. El modelo más aceptado considera a la EOP como el resultado de la actuación sinérgica de factores ambientales y genéticos. El condicionamiento genético explicaría la susceptibilidad individual a desarrollar la enfermedad (mutación del gen SQSTM1) junto con la participación de los posibles factores ambientales participantes ^{49,64}.

Las GST constituyen una familia de enzimas que intervienen en la detoxificación celular y en la metabolización de las toxinas. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutation reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas, permitiendo su degradación. Se clasifican en siete familias (*alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta* y *zeta*) que se diferencian tanto en su secuencia, como en sus propiedades inmunológicas y papel fisiológico ^{65,66}. GSTM1, GSTP1 y GSTT1 son las GST más estudiadas y las que con mayor frecuencia se han relacionado con patologías humanas ⁶⁷. Variaciones en estos genes podrían modificar la susceptibilidad a factores ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

2- GEN DEL SEQUESTOSOMA1. ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Actualmente la hipótesis más factible para explicar la etiopatogénica de la EOP es una conjunción de factores ambientales y factores genéticos. De acuerdo con la teoría genética, el gen candidato más probable es el gen SQSTM1, que codifica a la proteína

p62. La proteína p62 juega un papel importante en la encrucijada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis ^{61,62}.

2.1- GEN DEL SEQUESTOSOMA1 (SQSTM1) Y PROTEÍNA P62

El gen del sequestosoma1 está localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35.3). Su transcrito tiene un tamaño de 16kb repartidas en 8 exones. El gen SQSTM1 se traduce en una proteína de 62kDa a la cual se la puede denominar proteína p62 o proteína del sequestosoma1. La proteína p62 consta de 434 aminoácidos ^{68,69}.

La proteína p62 tiene diferentes dominios entre los que se encuentran: un dominio PB1 (Phox and Bem1) (82 aminoácidos), un dominio ZZ (región con *dedos de Zinc*) (35 aminoácidos), un dominio TRAF6 (26 aminoácidos), dos dominios PEST (regiones ricas en prolina, glutamina, serina y treonina) (28 y 32 aminoácidos respectivamente), un dominio LIR entre ambos dominios PEST (21 aminoácidos) y un dominio UBA (48 aminoácidos) (Figura 4) ⁷⁰.

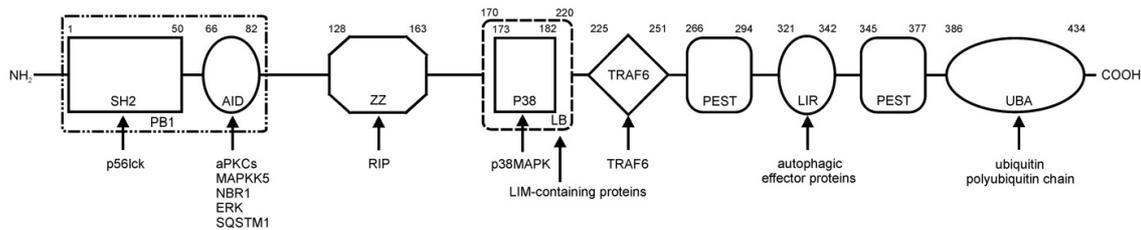


Figura 4. Representación gráfica de los dominios de la proteína p62 ⁷⁰.

2.2- FUNCIONES DE LA PROTEÍNA P62

La compleja red de señalización que determina cuándo las células crecen, se dividen, entran en senescencia o mueren, está compuesta por un bajo número de moléculas señalizadoras que otorgan a todos estos procesos una muy alta fiabilidad. Este control tan estricto es posible gracias a las proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras es la proteína p62, que tiene un papel fundamental en gran variedad de funciones celulares, interviniendo en procesos como la supervivencia celular, la apoptosis, la autofagia y la degradación proteica a través del proteosoma ^{68,70,71}.

Una de las características principales de la proteína p62 es su capacidad para ubiquitinar a otras proteínas. Este marcaje con residuos de ubiquitina es posible gracias al dominio UBA de la proteína p62 ^{72,73}. La capacidad de ubiquitinización de la proteína p62 será la base para el resto de sus funciones.

2.2.1- Degradación de proteínas a través del proteosoma

A través del proteosoma se eliminan proteínas con una vida media corta, proteínas defectuosas o proteínas que ya han cumplido su función. La degradación proteica a través del proteosoma requiere que las proteínas que van a ser eliminadas sean ubiquitinizadas con residuos de Lys-48 ⁷⁴.

La proteína p62 participa activamente en la degradación de proteínas a través de la vía del proteosoma: a través de su dominio UBA es capaz de llevar a cabo la poli-ubiquitinización de las proteínas a eliminar y a través de su dominio PB1, es capaz de interactuar con la subunidad Rpt1 del proteosoma facilitando la eliminación proteica ⁷⁵⁻⁷⁷.

2.2.2- Apoptosis

La muerte de las células mediante el proceso de apoptosis está marcada por una secuencia bien definida de cambios morfológicos consecuentes de este proceso. Las células disminuyen de tamaño, se condensan y luego se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos limitados por membranas que generalmente son absorbidos por otras células; los constituyentes celulares no se liberan al medio extracelular, donde podrían tener efectos nocivos sobre las células circulantes ⁷⁸⁻⁸⁰.

Hay dos vías principales que desencadenan la apoptosis de una célula: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca está desencadenada por el estrés celular o por el daño en el DNA; estos estímulos causan una cascada de señales que desembocan en la mitocondria y en la activación de las caspasas 9, 3 y 7 causando la muerte celular. La vía extrínseca se activa por los factores de necrosis tumoral (TNF) que reaccionan con receptores específicos (receptores TNF) localizados en la membrana plasmática de la célula; estos receptores activan directamente a una caspasa iniciadora, la caspasa 8, que a su vez activa a las caspasas efectoras “*corrientes abajo*” produciéndose la muerte celular ⁷⁸⁻⁸⁰.

La proteína p62 lleva a cabo un papel crucial en la ruta apoptótica extrínseca: la proteína p62 (a través de su dominio UBA) ubiquitina a la caspasa 8, permitiendo que se activen las caspasas efectoras, pudiéndose llevar a cabo la apoptosis ^{77,81}.

2.2.3- Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado a lo largo de la evolución que interviene en el mantenimiento de la homeostasis celular. La autofagia participa en el recambio de las mitocondrias (proceso denominado mitofagia) y de otros orgánulos celulares como retículo endoplásmico o peroxisomas; además, aclara los agregados de

proteínas ubiquitinadas que aparecen durante el estrés o las proteínas con alteraciones del plegamiento. Por otra parte, la autofagia permite a la célula generar sustratos para la síntesis de ATP durante los episodios de carencia de nutrientes o de incremento del estrés oxidativo. Durante el proceso de autofagia se forman vesículas que engloban al material que será degradado; estas vesículas reciben el nombre de autofagosomas. Los autofagosomas se fusionan con lisosomas (creándose el autofagolisosoma), de modo que las enzimas lisosómicas se encargan de digerir su contenido ⁸².

Un importante papel de la autofagia en mamíferos es el aclaramiento de las proteínas ubiquitinadas, proceso en el que desempeña un papel central la proteína p62. En primer lugar se produce la dimerización de la proteína p62 a través de su dominio PB1. Una vez formados los acúmulos de proteína p62, se produce la unión y ubiquitinización de las proteínas que serán eliminadas (a través del dominio UBA). Para finalizar, los agregados de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma. Este anclaje se produce por la interacción entre la proteína p62 (a través de su dominio LIR) y la proteína LC3, la proteína LC3 se unirá a la membrana del autofagosoma. Tanto la proteína p62 como la proteína LC3 serán eliminadas en el proceso de autofagia junto con el resto de proteínas previamente marcadas con ubiquitina ⁸³⁻⁸⁶ (Figura 5).

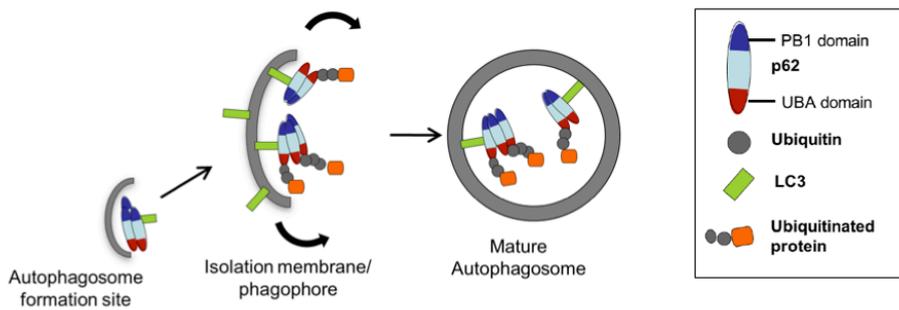


Figura 5. Implicación de la proteína p62 en el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas mediante el proceso de autofagia. La proteína p62 crea dímeros que unen y ubiquitinizan a las proteínas que serán eliminadas; los agregados de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma mediante la interacción entre la proteína p62 y la proteína LC3 ⁸³.

2.2.4- Supervivencia celular

La proteína p62 induce la proliferación celular a través de la activación de la ruta NF- κ B. Este proceso que es fundamental en la maduración de los osteoclastos y, por lo tanto, en la resorción y remodelado óseos ^{87,88}.

Tanto los osteoblastos como las células estromales secretan RANKL, ligando que se unirá a su receptor, presente en los precursores osteoclasticos, RANK ^{38,89}. Esta unión causa que TRAF6 (factor asociado al receptor TNF) se una a RANK, lo que induce que p62 se una a TRAF6 a través del dominio TRAF6, unión que favorece la dimerización de p62 a través de su dominio PB1. Para que se produzca la dimerización de p62 es necesario que TRAF6 se autoubiquitine con residuos de Lys-63, lo cual ocurre gracias a

su actividad E3 ligasa ⁹⁰. Una vez que la p62 está unida a TRAF6 controla la adición de más residuos de Lys-63 a TRAF6 y causa que la quinasa α PKC se una a su dominio PB1. Las siguientes etapas consisten en el desbloqueo del factor NF κ B, factor que en su forma inactiva se encuentra secuestrado en el citoplasma por I κ B, evitando así que entre en el núcleo y pueda desarrollar su función. La quinasa α PKC fosforila a la subunidad IKK β de la quinasa IKK (también conocida como NEMO). Una vez que IKK está fosforilada, se activa, estando en condiciones de fosforilar a I κ B. Una vez que I κ B se fosforila se suelta de NF κ B y su conformación es adecuada para que sea ubiquitinizada (Lys-48) y así degradada en el proteosoma, permitiendo que el factor NF- κ B entre en el núcleo ^{70,71,91-94} (Figura 6).

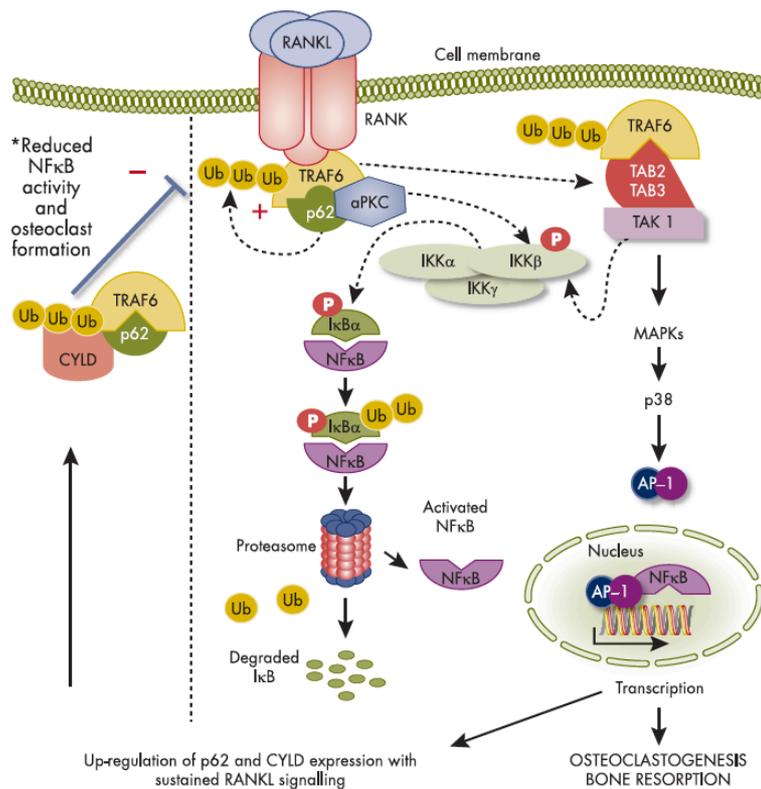


Figura 6. Cascada de señalización necesaria para el control de la ruta NF- κ B mediada por la interacción RANK-RANKL ⁷⁷

La ubiquitinización de TRAF6 también supone la activación del complejo TAB1-TAB2-TAK1 (TABs). El complejo TAB1-TAB2-TAK1 activado interviene en la fosforilación de la quinasa IKK y, por lo tanto, en la translocación del factor NF- κ B del citoplasma al núcleo ⁹⁵. Otra función del complejo TAB1-TAB2-TAK1, a través de la vía MAPK-p38, es mediar la síntesis del factor de transcripción AP-1 que, aunque en menor medida que NF- κ B, también interviene en la maduración y activación del osteoclasto ⁹⁶⁻⁹⁹ (Figura 6).

Cuando los osteoclastos han alcanzado la madurez es necesaria una señal negativa que frene tanto su proliferación como su activación. Esta señal negativa consiste en el bloqueo de la activación de la ruta NF- κ B, proceso en el que la proteína p62 cumple una doble función; por una parte media la ubiquitinización de la proteína CYLD, un inhibidor

de la ruta NF- κ B y, por otra parte, se auto-degrada gracias a la presencia de sus dominios PEST ⁷⁷. La proteína p62 tiene dos dominios PEST que son dominios ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que actúan como péptido señal que dirige la degradación de proteínas de una vida media corta ¹⁰⁰. La proteína CYLD es una desubiquitinasa y su síntesis depende del factor de transcripción NF- κ B. La proteína p62 ubiquitina con residuos de Lys-63 a la proteína CYLD lo cual supone la activación de la proteína CYLD que, una vez activada, está en disposición de desubiquitinar a la proteína TRAF6 y con ello parar la activación de la ruta NF- κ B ¹⁰¹⁻¹⁰⁴ (Figura 6).

2.3- PROTEÍNA P62 Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Hay múltiples evidencias de que alteraciones genéticas juegan un papel importante en el desarrollo de la EOP : una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%), con un riesgo relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre los familiares de pacientes con EOP y en la mayor parte de las familias, la herencia tiene un patrón autosómico dominante con una alta penetrancia a partir de la sexta década ^{59,60}.

El gen candidato más considerado es el gen SQSTM1, que codifica la proteína p62. Esta proteína juega un papel importante en la encrucijada de señales celulares relacionadas con las osteoclastogénesis. Se ha descrito que entre el 20-40% de los pacientes con antecedentes familiares y entre el 5-10% de los pacientes de carácter esporádico son portadores de mutaciones en el gen SQSTM1 ^{61,62}. Variaciones en la proteína p62 causarían un desacoplamiento en la actividad de los osteoclastos, base patogénica del desarrollo de la EOP. La mayoría de los pacientes portadores de mutaciones en la proteína p62 tienen la mutación localizada en el dominio UBA de la proteína p62. El dominio UBA desempeña un papel importante en el freno de la activación de la ruta NF- κ B. Mediante la ubiquitinización con residuos de Lys-63 es capaz de activar a la proteína CYLD; la proteína CYLD desubiquitina a la proteína TRAF6 y con ello frena la activación de la ruta NF- κ B y, por lo tanto, detiene la maduración y activación de los osteoclastos. En estos pacientes, la proteína p62 no es capaz de activar correctamente a la desubiquitinasa CYLD y no se lleva a cabo la inhibición de la activación de la ruta NF- κ B, lo que desemboca en el desacoplamiento de la maduración y la activación de los osteoclastos y en el consecuente desarrollo de la EOP (Figura 7) ^{77,87,105}.

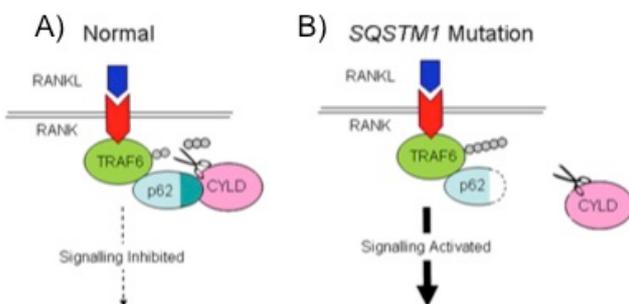


Figura 7. Bajo circunstancias normales la proteína p62 ubiquitina a la proteína CYLD, produciéndose el freno de la osteoclastogénesis (A). En los pacientes portadores de mutaciones en el dominio UBA de la proteína p62 no son capaces de activar a la proteína CYLD, produciéndose un desacoplamiento en la osteoclastogénesis, causando el desarrollo de la EOP (B) ¹⁰⁵

3-AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

3.1 AUTOFAGIA

La autofagia abarca varios tipos de procesos celulares en los que el propio material citoplasmático es degradado en los lisosomas, lo que permite el reciclaje de diversos orgánulos y proteínas de vida media elevada, constituyendo un tipo de control de la calidad intracelular al tiempo que contribuye a la homeostasis energética de la célula en períodos de estrés o falta de nutrientes mediante el suministro de los aminoácidos y otras moléculas obtenidas durante la digestión del material citoplasmático. Igualmente, juega un papel relevante en los procesos de desarrollo y diferenciación de los tejidos, pudiendo llegar a determinar la muerte celular bajo circunstancias específicas por lo que a la autofagia también se la denomina en ocasiones “muerte celular programada de tipo II”⁸².

Existen hasta tres tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia. En la microautofagia, es la propia membrana del lisosoma la que, a través de invaginaciones, engloba al material que va a ser degradado. La autofagia mediada por chaperonas constituye una vía autofágica que no implica la reorganización del sistema de membranas sino que una serie de chaperonas (Hsc70 y otras co-chaperonas) transportan las proteínas citosólicas marcadas específicamente hasta unos complejos de translocación donde finalmente serán degradadas. Por último, la macroautofagia, a la que a partir de aquí nos referiremos como “autofagia”, constituye la vía mas importante de las tres descritas. En la autofagia se forman vesículas lipídicas que posteriormente se elongan para dar lugar a una estructura membranosa denominada “autofagosoma”. El autofagosoma engloba a los orgánulos o al material que va a ser degradado. Cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma se origina el llamado autofagolisosoma, en el cual se produce la digestión del material originalmente encapsulado⁸².

El conocimiento del mecanismo molecular que rige todo este proceso comenzó a vislumbrarse en los años 90 con el descubrimiento de los genes ATG (*autophagy related genes*) en levaduras¹⁰⁶. Dentro del proceso de autofagia pueden distinguirse tres estadios: inducción, elongación y finalización¹⁰⁷.

La célula regula la inducción de la ruta autofágica principalmente a través de la proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Cuando mTOR se presenta en su forma activa actúa como un regulador negativo de la autofagia bloqueando la ruta mediante la fosforilación de Atg13. Sin embargo, cuando mTOR no está activa, el complejo formado por Atg13-ULK1-Atg10-FIP200 (complejo ULK1) se transloca a situaciones cercanas al retículo endoplasmático (PAS, *phagophore assembly sites*) donde se favorece la formación de los autofagosomas. El complejo ULK1 promueve la función de un segundo complejo con actividad fosfatidilinositol 3-quinasa formado por las proteínas Beclina-1, Vps15, Vps34, Ambra-1 o Atg14 (entre otras). La síntesis de PI(3P)

por parte de este último complejo, permite el reclutamiento de más proteínas (WIPIs) necesarias para la elongación de la vesícula en formación. La actividad de este complejo PI-3K también puede bloquearse a nivel de Beclina-1 por acción de la proteína Bcl-2. A continuación se produce el alargamiento de las vesículas hasta formar sistemas membranosos capaces de englobar proteínas y orgánulos completos. Para que se produzca la elongación es necesario que se formen tanto el complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 como el conjugado LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-PE o LC3-II), insertándose ambos en la membrana de la vesícula en expansión. En la formación del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 es fundamental la participación de Atg10, una ligasa de tipo E2 ^{82,107-109}. (Figura 8).

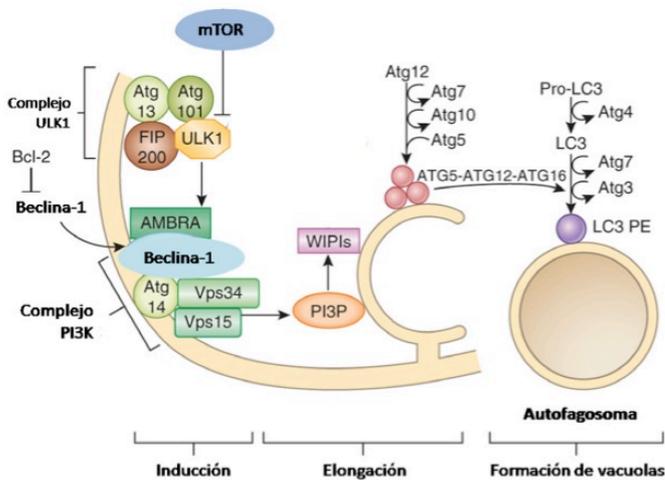


Figura 8. Etapas y mecanismo molecular del proceso de autofagia ¹¹⁰

El complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 también favorece la conjugación de LC3-I con PE. Posteriormente, Atg12-Atg5-Atg16L1 se disocia tras sellarse el autofosoma, permaneciendo LC3-II en su membrana y pudiéndose emplear este último como un marcador de la presencia de vesículas autofágicas (Figura 9). Finalmente se produce la fusión de los autofosomas con los lisosomas, gracias a la intervención de varias proteínas transmembrana de estos últimos, como LAMP y CLN-2. De esta forma, se lleva a cabo la degradación del material citoplasmático inicialmente englobado ^{82,107-109}.

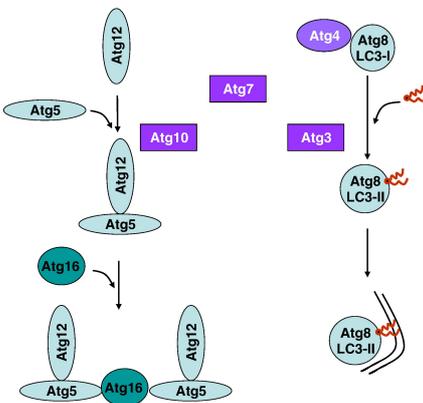


Figura 9. Ruta de formación del complejo Atg5-Atg21-Atg16L1 y de conjugación de LC3-I con PE. Atg7 actúa como una ligasa E1, mientras que Atg10 y Atg3 lo hacen como ligasas de tipo E2 ¹⁰⁹

3.2 AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

La interacción entre factores ambientales y genéticos es la hipótesis más aceptada para explicar el origen de la EOP. Son varios los factores ambientales que se han postulado como posibles factores etiológicos en la EOP : contacto con perros, consumo de carne y aguas no controladas; pero sin embargo los factores ambientales implicados con mayor frecuencia han sido los agentes infecciosos, principalmente los virus.

En 1974 *Rebel y cols* describieron por primera vez inclusiones intra-citoplasmáticas en los osteoclastos ⁵⁷. El parecido de estas inclusiones con estructuras propias de los paramixovirus llevó a la hipótesis de que la enfermedad pudiera estar causada por infecciones persistentes por el virus del sarampión u otros paramixovirus ⁵⁵⁻⁵⁷. La validez de esta teoría ha sido discutida a lo largo de los años por distintos equipos científicos alimentándose continuamente el debate al no confirmarse los resultados e incluso no consiguiéndose detectar ninguna secuencia vírica ¹¹¹⁻¹¹³.

Con el paso del tiempo, la hipótesis de que una infección vírica puede causar el desarrollo de la EOP se ha ido dejando de lado, reforzándose la hipótesis que postula que las inclusiones intra-citoplasmáticas realmente corresponden con agregados proteicos similares a los que se observan en las enfermedades neurodegenerativas ^{114,115}, agregados que se crean como consecuencia de alteraciones en el proceso de autofagia.

Son varias las evidencias que relacionan el origen y desarrollo de la EOP con alteraciones en la regulación del proceso de autofagia. En pacientes con EOP se han encontrado mutaciones en los genes SQSMT1, VCP y OPTN, genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de autofagia ^{105,116}. En el año 2011 se generó un modelo murino para la EOP que se caracteriza por ser portador de una mutación en el gen SQSTM1; en este modelo se ha descrito cómo se produce una mayor expresión de genes relacionados con la autofagia, como SQSMT1, ATG5 y LC3 ¹¹⁷. En pacientes con EOP se han detectado niveles más elevados de la proteína p62, independientemente de si los pacientes son o no portadores de mutaciones en el gen SQSTM1 ^{118,119}.

4-LONGITUD TELOMÉRICA Y METABOLISMO ÓSEO

Los telómeros son regiones de DNA no codificante, localizados en el extremo de los cromosomas, consisten en repeticiones en tándem de una secuencia de seis nucleótidos (TTAGGG) que desempeñan un papel muy importante en la integridad y estabilidad de los cromosomas ^{120,121}.

El DNA telomérico (tDNA) consiste en dos hebras desiguales. Su extremo 3' se caracteriza por ser rico en guaninas y citosinas; la hebra 5'-3' es rica en guaninas (se la denomina hebra G) y la hebra 3'-5' es rica en citosinas (se la denomina hebra C). La hebra G (en su extremo 3') no se aparea con el la hebra C, se crea un extremo monocatenario

que constituye el extremo 3' de los cromosomas. El extremo monocatenario adopta una estructura secundaria por apareamiento de las bases de guanina generándose un *D-loop*. El extremo telomérico forma un bucle y crea un dúplex de DNA denominado *T-loop*. Esta estructura en forma de lazo se estabiliza gracias a la unión de proteínas específicas¹²⁰. La proteína que se une y protege el extremo monocatenario de la hebra G es la proteína POT1¹²². Hay otras proteínas que se unen a lo largo de las repeticiones teloméricas dando lugar a un complejo ribonucleoproteico altamente ordenado, cuya función es proteger el extremo telomérico. Entre todas estas proteínas destacan las proteínas TRF-1 y TRF-2^{123,124} (Figura 10).

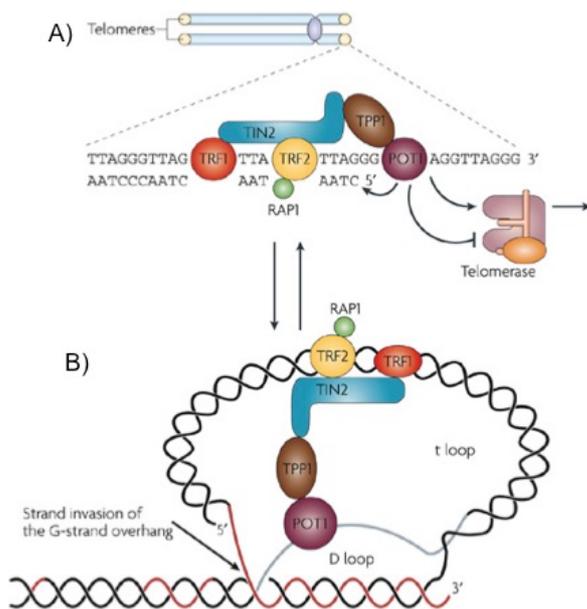


Figura 10. Estructura del extremo telomérico linealizado (A) y del extremo telomérico formando el *D-loop* y el *T-loop* (B) junto a sus proteínas asociadas¹²⁵

En cada ciclo de replicación del DNA de las células somáticas y, consecuentemente, en cada división celular, se produce una pérdida de entre 100 y 200 pb de la secuencia telomérica. Esto es debido a la ausencia de polimerasas capaces de replicar la cadena de DNA completa. De esta forma, después de un número de divisiones determinado (entre 40 y 70) la longitud telomérica llega a ser crítica (2.5 kb) lo cuál supone que el cromosoma pierda su protección y las células entren en estado de senescencia, alcanzando el punto de Hayglick. Se trata de un mecanismo irreversible que se acompaña de cambios morfológicos y de expresión génica que desembocan en la apoptosis celular, contribuyendo, por lo tanto, al envejecimiento del organismo^{124,126}. El acortamiento de los telómeros actúa como un "reloj mitótico": determina el número máximo de divisiones que puede llevar a cabo una célula. Aunque la longitud telomérica varía en función del tipo celular, hay una relación entre la longitud telomérica de todos los tejidos de un individuo. Está establecido que la longitud de los telómeros a nivel leucocitario sirve como reflejo de la longitud telomérica del resto de tejidos de un organismo, la longitud telomérica de los leucocitos es el biomarcador del envejecimiento de un organismo^{126,127}.

En las células germinales y tejidos en desarrollo existe un mecanismo de replicación de los telómeros, la activación de la telomerasa. Se ha demostrado que la telomerasa está activa en las células endometriales, en la capa basal de la epidermis y en el sistema hematopoyético¹²⁸⁻¹³². En las células en las que está activa la expresión de la telomerasa, el tDNA permanece en un estado de dinamismo debido a pérdidas y adicciones. De esta forma, la longitud telomérica se encuentra regulada dentro de unos límites bien definidos, permaneciendo en un estado de equilibrio que se ve influenciado por factores genéticos, ambientales y fisiológicos: “homeostasis telomérica”. Cuando la célula replica su material genético, la telomerasa se alinea con el extremo de la hebra G y lleva a cabo su extensión. De este modo los telómeros mantienen su longitud y se mantiene la estabilidad cromosómica evitando la recombinación¹²¹.

La telomerasa es un complejo formado por tres integrantes principales: una proteína de la familia de las transcriptasas inversas (TERT), un ácido ribonucleico denominado TERC y una proteína auxiliar denominada Disquerina (DKC1)¹³³ (Figura 11).

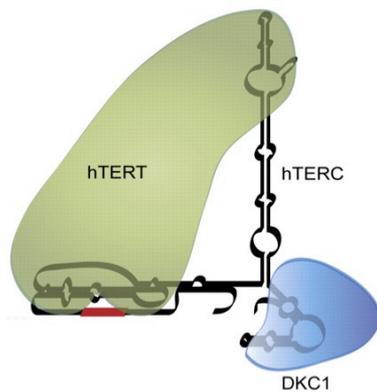
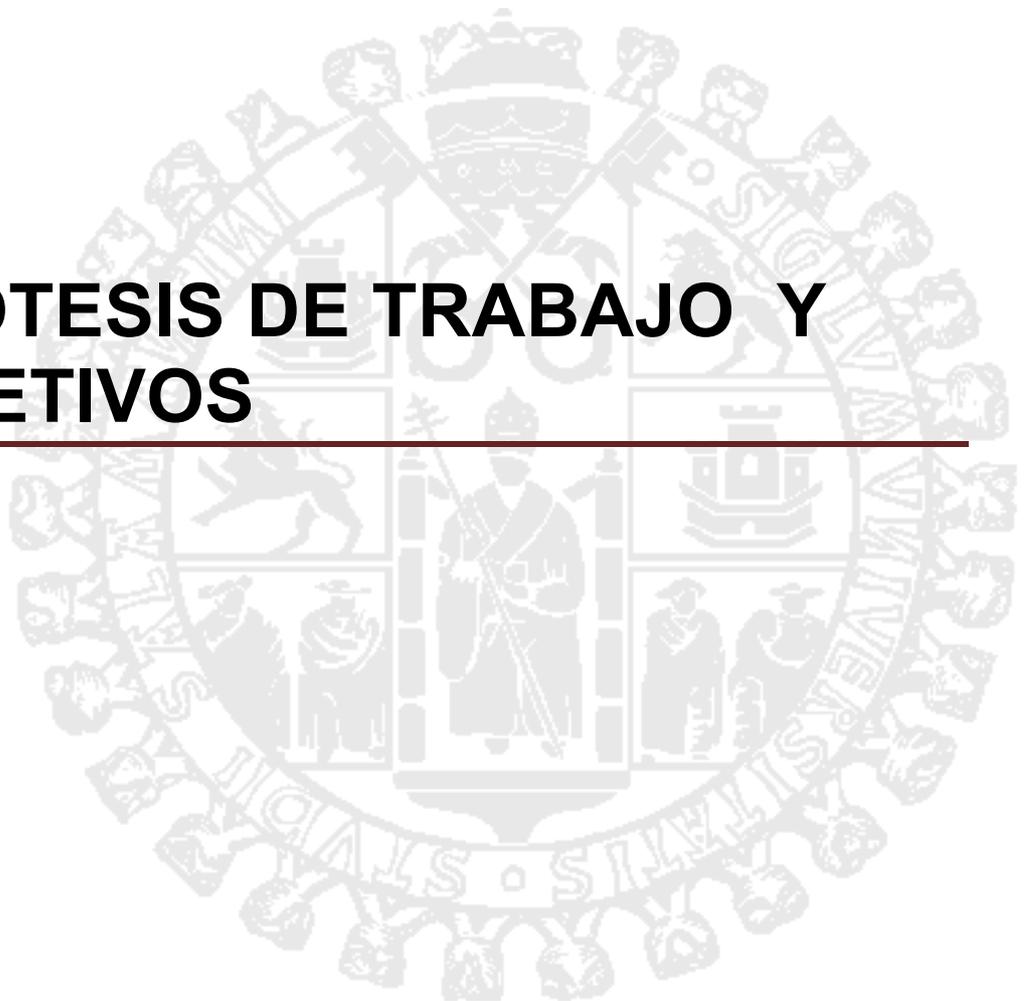


Figura 11. Estructura del complejo de la telomerasa¹²⁶

Múltiples estudios muestran cómo alteraciones en el mantenimiento de la longitud telomérica y en la actividad de la telomerasa están relacionadas con diferentes enfermedades como son: cáncer¹³⁴, enfermedades degenerativas¹³⁵, enfermedades cardiovasculares¹³⁶, artritis reumatoide¹³⁷, espondilitis¹³⁸ u osteoporosis¹³⁹. El mantenimiento de la longitud telomérica es clave en el envejecimiento del hueso: ratones a los que se suprimió la expresión de TERC mostraron una disminución de la masa ósea debido a la alteración del equilibrio resorción-absorción ósea^{140 141}.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



La Enfermedad Ósea de Paget es una enfermedad que se define como un trastorno esquelético, focal y crónico. Se produce debido a que los osteoclastos aumentan en número, tamaño y actividad. El recambio óseo se acelera, con un gran aumento de la resorción ósea acoplada a una formación excesiva y desorganizada de hueso; lo que genera un hueso no laminar (plexiforme) muy vascularizado, aumentado de volumen y con resistencia disminuida. Sus principales manifestaciones clínicas son el dolor, la deformidad ósea y la fractura.

La EOP tiene una distribución geográfica irregular, diagnosticándose en casi todos los lugares del planeta. En España la prevalencia está en torno al 1,5% de la población mayor de 55 años, existiendo lugares de alta prevalencia como son la Sierra de la Cabrera (6,4%) o la Comarca de Vitigudino (provincia de Salamanca) con una prevalencia de alrededor del 5,7%. Aún siendo la enfermedad ósea más frecuente tras la osteoporosis, hay opiniones dispares a la hora de afirmar si los pacientes con EOP sufren un envejecimiento más o menos acelerado que los individuos sin la enfermedad.

La EOP es una enfermedad multifactorial en la que participan factores ambientales y genéticos. La exposición a toxinas ambientales durante la infancia ha sido descrito como un posible factor a tener en cuenta en el desarrollo de la enfermedad; pudiendo existir una relación entre la mala metabolización de estas toxinas y el desarrollo de la EOP. Se ha descrito una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%) con un riesgo relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre los familiares de pacientes con EOP. Se hereda con un patrón autosómico dominante con alta penetrancia y un mecanismo multifactorial que no puede justificarse por una sola mutación genética. El gen candidato más factible es el gen SQSTM1, que codifica la proteína p62. Esta proteína juega un papel importante en la encrucijada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis. Por otra parte, la proteína Vav3 es un factor esencial en la regulación del remodelado citoesquelético necesario para que se desarrolle la función del osteoclasto; alteraciones en el gen VAV3 también podrían influir en el desarrollo de la EOP.

En los osteoclastos del hueso pagético se observan inclusiones citoplasmáticas que en un principio se asociaron con nucleocapsides virales. Actualmente se propone que estas inclusiones podrían ser agregados proteicos, resultado de alteraciones en el proceso de autofagia. Siendo las alteraciones en este proceso una teoría etiopatogénica emergente para intentar explicar el origen de EOP.

Por todo ello y con el fin de profundizar en el conocimiento de la biología de la Enfermedad Ósea de Paget y para intentar determinar nuevos factores que ayuden a predecir su desarrollo y evolución nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Analizar la longitud telomérica en pacientes con EOP para estudiar su relación con los polimorfismos de los genes TERC y TERT y con las diferentes características

clínicas de los pacientes para así poder evaluar el rol del mantenimiento de la longitud telomérica en el desarrollo de la EOP y definir, de un modo más exacto, el envejecimiento que sufren los pacientes con EOP.

2- Caracterizar si la variabilidad de los genes GSTM1, GSTP1 y GSTT1, implicados en la metabolización de toxinas exógenas, se relaciona con un mayor riesgo a desarrollar EOP.

3- Caracterizar si variaciones alélicas en el gen VAV3, implicado en la activación osteoclástica, pueden modificar el riesgo a padecer EOP.

4- Caracterizar si variantes alélicas en los genes ATG2B, ATG5, ATG16L1 y ATG10, implicados en el proceso de autofagia, pueden aumentar el riesgo de padecer EOP.

5- Estudiar las alteraciones moleculares en el gen SQSTM1 en pacientes con EOP a fin de encontrar relación entre la mutación del gen SQSTM1 y el desarrollo de la enfermedad.

PACIENTES Y MÉTODOS



1- PACIENTES Y CONTROLES

Para la realización del estudio molecular del gen SQSTM1 se han analizado 310 pacientes con diagnóstico probado de EOP. Como grupo control se han estudiado a 50 individuos sin antecedentes de enfermedades óseas y con niveles normales de FA.

Para el estudio de asociación de variantes alélicas en los genes ATG2B, ATG10, ATG16L1 y ATG5 se han analizado 238 pacientes con diagnóstico probado de EOP, como grupo control se han estudiado 264 individuos sin antecedentes de enfermedades óseas, con niveles normales de FA y pareados en edad y sexo con el grupo de pacientes.

Para el estudio de variantes alélicas en el gen VAV3 se han estudiado 238 pacientes con EOP y 253 individuos control sin antecedentes de patologías óseas, con niveles normales de FA y pareados en edad y sexo.

Para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y de las variantes alélicas del gen GSTP1 se han analizado 148 pacientes con EOP y 207 controles sin antecedentes de enfermedades óseas, con niveles normales de FA y pareados en edad y sexo.

Para el estudio de la longitud telomérica y de las variantes alélicas de los genes TERT y TERC hemos analizado 90 pacientes con EOP y 90 controles sin antecedentes de patologías óseas, con niveles normales de FA y pareados en edad, sexo y hábitos tabáquicos con el grupo de pacientes.

Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron atendidos en la consulta de Metabolismo Óseo adscrita al Servicio de Enfermedades Sistémicas Autoinmunes y Reumatología del Hospital Universitario de Salamanca entre Enero de 1990 y Febrero de 2014.

Todos los sujetos estudiados, tanto del grupo de pacientes como del grupo control, firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio que fue aprobado por el Comité Ético del Hospital .

1.1 DEFINICIONES

- Diagnóstico probado de Enfermedad Ósea de Paget.

Se consideró diagnóstico probado de EOP a la elevación de los marcadores de formación o resorción ósea y una imagen radiológica o gammagráfica compatible con EOP en ausencia de otras enfermedades óseas.

- Enfermedad Ósea de Paget activa.

Se consideró enfermedad activa cuando existía una elevación de FA total sobre el límite superior de la normalidad.

- Enfermedad Ósea de Paget inactiva.

Se consideró enfermedad inactiva cuando los niveles de FA total fueron iguales o inferiores al límite superior de la normalidad.

1.2 RECOGIDA DE DATOS

Se realizó un estudio retrospectivo con recogida de datos epidemiológicos (número de historia, fecha y lugar de nacimiento, residencia, sexo, familiares afectados de EOP y establecimiento del árbol genealógico), clínicos (motivo del diagnóstico, año del diagnóstico, médico diagnosticador, clínica asociada, complicaciones, tratamientos recibidos, motivo de la indicación del tratamiento y fecha de inicio de cada tratamiento), de laboratorio (FA total, calcio y marcadores de remodelado óseo), datos radiológicos y datos gammagráficos.

Los datos de laboratorio correspondientes a la FA se estandarizaron al variar la técnica de laboratorio para su determinación a lo largo del estudio; para ello se recogió el valor fijado como límite superior de la normalidad en cada momento determinándose el número de veces que la FA estaba por encima de este límite en vez de su valor absoluto.

Para calcular el grado de extensión de la enfermedad se determinó el índice anatómico de Renier basado en el índice de Coutris el cual da como resultado el porcentaje de afectación sobre el total del esqueleto (Tabla1) ¹⁴².

De entre todos los huesos afectados, hemos puesto especial atención a la afectación del cráneo, debido a sus peculiaridades y a que está descrito como el hueso donde la actividad pagética es mayor en el momento del diagnóstico ²⁰

Tabla 1. Índice anatómico de Renier ¹⁴²

Localización ósea	Porcentaje	
Cráneo y cara (mandíbula)	17 (21)* (2)	
Sacro	2	
Coxis	4,5	
Fémur	9,5 (9)*	
Rótula, Clavícula	0,5	
Tibia	5	*Coeficiente en mujeres
Radio, cúbito, peroné	1	**El porcentaje medio para una vértebra cervical es de 0,2 (0,3 para C2), 0,3 para un vértebra torácica (de 0,25 a 0,5 según la vértebra) y 0,65 para una vértebra lumbar (de 0,55 a 0,75 según la vértebra)
Pie	4	
Escápula	2	
Húmero	3,5	
Mano-muñeca	2	
Toda la columna	8,5 (8)*	
Columna cervical	1,5**	
Columna dorsal	3,7**	
Columna lumbar	3,3**	
Costillas	5	
Esternón	0,5	

2- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1 AISLAMIENTO DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.

Se extrajo DNA genómico de alto peso molecular a partir de sangre periférica.

Las células nucleadas se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de ddH₂O durante 30 minutos a 1500rpm a 4°C).

Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M sacarosa, 50mM Tris-HCl pH=7.5, 25mM KCl y 5mM MgCl₂) el cual proporciona la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos.

El botón de células nucleadas se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de $5 \cdot 10^6$ células/mL, tras lo cual se añade EDTA 0.5M pH=8 (concentración final 10mM), un quelante de iones divalentes que posibilita la

inactivación de las nucleasas.; SDS (concentración final 1%) para romper las membranas celulares; y proteinasa K para degradar las proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH= 8 (para prevenir que el DNA fuera “atrapado” en la fase intermedia: entre la fase acuosa y la orgánica) y CIIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Se sometió a centrifugación. Con este proceso el DNA permaneció en la fase acuosa y se limpió de otros residuos al mezclarlo con CIAA y centrifugar para separar de nuevo las dos fases, una en la que está contenido el DNA y otra que contiene los detritus celulares. Tras este paso se añade etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA que se recupera, se lava con etanol al 70% y finalmente se resuspende en agua estéril.

La concentración de DNA y el grado de contenido proteico se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de DNA/RNA (GeneQuant, Pharmacia), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA /ml} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 μg de DNA / ml).

El cociente DO260 / DO280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de RNA, que se elimina tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando de nuevo.

2.2 AISLAMIENTO DE RNA Y SÍNTESIS DEL cDNA DEL GEN SQSTM1.

El RNA total se extrajo a partir de sangre periférica siguiendo una modificación del método de Chomczynski y Sacchi ¹⁴³ empleando el reactivo Trizol (Invitrogen). Para ello, se utilizó 1 mL de Trizol. Después se realizó una extracción selectiva del RNA mediante separación de fases tras la adición de 200 μL de cloroformo por cada mL de Trizol. El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol, se centrifugó a 12000g durante 10 min a 4°C y, finalmente, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato 0.1%, Sigma), calentando todo a 65°C para favorecer la disolución.

La concentración del RNA se determinó en un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia), midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. (coeficiente de extinción

RNA ($C = 25 \text{ (cm} \cdot \mu\text{g}/\mu\text{L})^{-1}$) y la presencia de contaminantes (proteínas, residuos de fenol) se comprobó midiendo el ratio A260/A220 (2.0-2.2) y A260/A280 (1.6- 1.8). La integridad de la muestra de RNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE.

La síntesis de cDNA se realizó mediante el sistema ImProm-IITM Reverse Transcription System (RT-PCR) (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente, se desnaturizó mediante calor una mezcla de 1 μg de RNA total y 0,5 μg del oligonucleótido (dT)15 a 70° C durante 5 minutos. El cDNA se sintetizó en presencia de 1U de la transcriptasa inversa ImProm-IITM, buffer ImProm-IITM 1X, 4 mM Cl₂Mg, una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos tri-fosfato) 0.5 mM, 20 u. del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNAsin y agua libre de RNAsas. La reacción se sometió durante 5 minutos a 25°C y, posteriormente, se incubó a 42°C durante 1 hora para permitir la síntesis del cDNA mediante la transcriptasa inversa. Finalmente, la enzima fue inactivada desnaturizando la mezcla durante 15 minutos a 70° C.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se había realizado con éxito, se amplificó mediante PCR parte del cDNA correspondiente al gen GAPDH, el cual se expresa constitutivamente en todos los tejidos. El programa de amplificación utilizado fue: [95°C 5' (94°C 30" , 55°C 30" y 72°C 30") x 30 ciclos, 72 °C 10']. Los cebadores utilizados fueron:

GAPDH _{Sentido} : 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'
GAPDH _{Anti-sentido} : 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'

La RT-PCR se llevó a cabo utilizando GoTaq Hot Start Polymerase® de Promega (5u/ μL de Go Taq Polymerase®, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 10 μM de cada cebador y 50 μg de cDNA). Esta enzima aumenta el rendimiento y especificidad de la reacción , y además de presenta actividad 5'-3' exonucleasa que permite la corrección de errores durante el proceso de síntesis.

El programa de PCR utilizado para la amplificación del cDNA del gen SQSTM1 fue: [95°C 5' (95°C 30 " ; 55°C 30" ; 72°C 1') x 35 ciclos, 72 °C 10']. Los cebadores utilizados fueron:

cDNA SQSTM1 _{Sentido} : 5' - ATG-GCG-TCG-CTC-ACC-3'
cDNA SQSTM1 _{Anti-sentido} : 5' -TCA-CAA-CGG-CGG-GGG-ATG-3'

3- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

3.1 ESTUDIO DE DELECCIONES MEDIANTE PCR MULTIPLEX

Mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) multiplex se estudió la presencia o ausencia de deleciones en los genes GSTM1 y GSTT1. Los cebadores y condiciones necesarios para llevar a cabo la PCR y los amplicones resultantes se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones empleadas para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1.

Cebadores
<i>C(+)</i> : Sentido: 5'-CGCCATCTTGTGCTACATTGCCCG-3'
<i>GSTM1</i> : Sentido: 5'-ATCTTCTCCTCTTCTGTCTC-3' Anti-sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<i>GSTT1</i> : Sentido: 5'-TTCCCTTACTGGTCCTACATCTC-3' Anti-sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
Programa de PCR
95°C 5 minutos 30 ciclos (94°C 30"/58°C 30"/72°C 45") 72°C 8 minutos
Fragmentos resultantes de PCR y correspondencia con el Genotipo
231, 450 y 158 pb : GSTM1(+)/GSTT1(+) 231 y 158 pb: GSTM1(+)/GSTT1(-) 450 y 158 pb: GSTM1(-)/GSTT1(+) 158 pb : GSTM1(-)/GSTT1(-)

Tras la PCR se obtuvieron hasta tres tipos de amplicones diferentes: amplicones de 450 pb, de 231 pb y de 158 pb. En función de las posibles combinaciones se dedujo el genotipo de cada individuo (Figura 12).

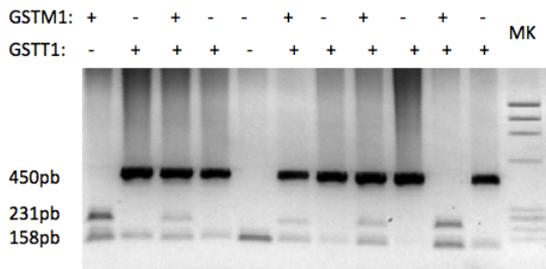


Figura 12. Ejemplo de resultados obtenidos en el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1

3.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR-RFLP

El estudio de polimorfismos en función de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) permite discriminar los alelos de un polimorfismo analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del producto de PCR con endonucleasas de restricción, que reconocen secuencias específicas en el DNA y lo escinden en ese punto.

Mediante RFLP se estudió el polimorfismo Ile105Val del gen GSTP1.

Para ello, se amplificó mediante PCR el fragmento de DNA correspondiente al exón donde se localiza el polimorfismo. Posteriormente, se digirieron 13 µL del producto de PCR con 10 U (1 µL) de la enzima de restricción BsmI durante 4-6 horas a 37 °C en un volumen final de 20 µL. Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones empleadas para el estudio del polimorfismo Ile105Val del gen GSTP1

Cebadores	
Sentido: 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3	
Anti sentido: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	
Programa de PCR	
95°C 5 minutos	
30 ciclos (94°C 30 segundos/55°C 30 segundos/72°C 30 segundos)	
72°C 5 minutos	
Amplicón: 176pb	
Enzima: BsmI	Digestión: 37°C / 4 Horas
Fragmentos resultantes de la digestión y correspondencia con el Genotipo	
176pb: AA	
176, 91 y 85 pb: AG	
91 y 85 pb: GG	

3.3 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TaqMan

En la discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan, la amplificación y la detección del genotipo ocurren simultáneamente. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que hibridan específicamente con cada alelo en la región donde se localiza el polimorfismo de estudio. Las sondas están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor ("quencher") en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta y ambos se encuentran próximos. Las sondas utilizadas en nuestro trabajo estaban marcadas con los fluorocromos VIC y FAM para cada alelo. La reacción de PCR requiere además :Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y cebadores sentido y anti-sentido. Se lleva a cabo en termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia. Durante la amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa, que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, al

desplazarse a lo largo de la cadena, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Al quedar separados, la fluorescencia emitida por el fluorocromo es captada por el lector (Figura 13). Además, la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, permitiendo en todo momento conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación.

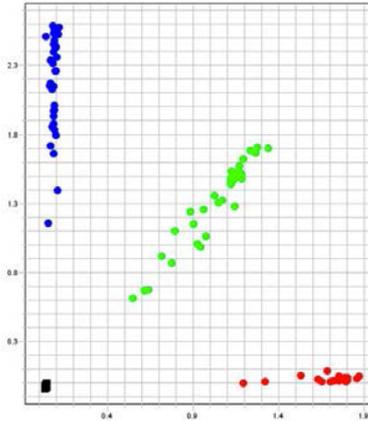


Figura 13. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan del polimorfismo rs7528153 del gen VAV3. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos AA, los verdes son heterocigotos AT y los rojos son homocigotos TT.

Mediante esta técnica se analizaron diversos polimorfismos de genes implicados en la autofagia, en la activación de la actividad resorptiva de los osteoclastos y polimorfismos del complejo de la telomerasa (Tabla 4). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador *Step One Plus Real Time PCR™* (Applied Biosystems).

Tabla 4. Polimorfismos estudiados mediante discriminación alélica con sondas TaqMan

Gen	Polimorfismo estudiado	Sonda Taqman (Applied Biosystems)
ATG2B	rs3759601	c_9690166_10
ATG16L1	rs2241880	c_9095577_20
ATG5	rs2245214	c_3001905_20
ATG10	rs1864183	c_11953871_20
VAV3	rs7528153	c_447698_10
TERT	rs2735940	c_1839086_10
TERC	rs2293607	c_16184740_10

4- ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Para realizar el estudio de la medida de la longitud de los telómeros se recurrió a la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a tiempo real cuantitativa comparativa.

Esta técnica permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia que detecta la fluorescencia emitida por intercalantes que se

unen al DNA amplificado. La monitorización de esta fluorescencia, permite analizar la cinética de la PCR en cada uno de sus ciclos, determinando el número de copias del fragmento de interés al inicio de la reacción. Este valor se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

La curva de fusión (*melting*) del producto es un parámetro que nos sirve para la caracterización del producto amplificado por su valor de temperatura de fusión (Tm).

El gen de referencia utilizado como control endógeno fue el 36b4 (Amplicón de un tamaño de 64pb y temperatura de anillamiento de 60°C). Los cebadores usados para su amplificación fueron:

36b4_{sentido} : 5'-CAGCAACTGGGAAGGTGTAATCC-3'
36b4_{anti-sentido} : 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

La fluorescencia captada por el lector en las PCR del gen 36b4 debe de ser la misma para todas las muestras ya que se parte de la misma cantidad de DNA en cada una de ellas. Sin embargo, la fluorescencia captada por el lector en las PCR de los telómeros varía de unas muestras a otras dependiendo de la cantidad de copias de cada individuo.

Los cebadores usados para la amplificación de los telómeros fueron:

Telómeros_{sentido}:
5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'

Telómeros_{anti-sentido} :
5'-CGGTTTGTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT-3'

Las reacciones de PCR se llevan a cabo con 5µg de DNA en placas ópticas de 96 pocillos. Se utilizó *FastStart Universal SYBR Green Master 2x (Rox)* (Roche). Para la reacción de amplificación de la zona telomérica se usó 1µl (5mM) de cebador "sentido " y 2,33µl (5mM) de cebador "anti-sentido "; para la amplificación del gen 36b4 se usó 0,4µl (5mM) de cada uno de los cebadores. Para ambas reacciones de amplificación la temperatura de anillamiento fue de 60° durante 30 segundos, llevándose a cabo 40 ciclos de amplificación.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador *Step One Plus Real Time PCR™* (Applied Biosystems).

5- ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1

5.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

Las muestras de DNA genómico obtenidas fueron amplificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando 12.5 µL del sistema PCR Master Mix 2X (400 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 50 unidades/mL de Taq DNA polimerasa en el buffer de reacción comercial a pH 8.5) (Promega), cebadores sentido y anti-sentido a una concentración final de 0.5 µM cada uno y 100 ng de DNA molde. El volumen final de reacción fue de 25 µL. Como control negativo, para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones fueran específicas para cada muestra de partida, se preparó un tubo de reacción con todos los componentes antes citados excepto el DNA molde.

En los pacientes con EOP con antecedentes familiares se amplificaron los ocho exones del gen SQSTM1. En el caso de los pacientes de carácter esporádico sólo se amplificaron los exones seis, siete y ocho. En la tabla 5 se muestran las secuencias de los cebadores.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores necesarios para amplificar los ocho exones del gen SQSTM1

Cebador	Secuencia de los cebadores
1-Sentido	5'-GGTAGCGGGGAAGGGGAGAGTAG-3'
1-Anti-sentido	5'-GTGGCTGCCCCCTCCCTTCT-3'
2-Sentido	5'-CCTGCCCTCTGTGGCTCAAG-3'
2-Anti-sentido	5'-CATGGTGAAACCTTGTCGCTACTAAA-3'
3-Sentido	5'-GGCCTTGCTGGCAGTGACAG-3'
3-Anti-sentido	5'-GCTAATTCCTCCCCAGGGC-3'
4-Sentido	5'-TGTAGCGTCTGCGAGGGAAAG-3'
4-Anti-sentido	5'-CAATCACACAAGAACCCTGCAAAG-3'
5-Sentido	5'-GGAACACAGGGACCTTGGCAAGA-3'
5-Anti-sentido	5'-TCAGCTGGCATTGTTGGGATAA-3'
6-Sentido	5'-CTTAGCTGCTTGTGGGGACT-3'
6-Anti-sentido	5'-CACTTACAAACCCGAGGGAG-3'
7-Sentido	5'-AGACCCCTGCAGCCTTAACT-3'
7-Anti-sentido	5'-TGTGGGAGGTTAGGAGTTGG-3'
8-Sentido	5'-CACTGTGGCCTGTGAGGAC-3'
8-Anti-sentido	5'-CGAGACCCAGGCTCACTG-3'

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático (Dual Cyclor System, Linus) usando las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla 6 . Las muestras de DNA se conservaron a -20°C.

Tabla 6. Condiciones de amplificación para los ocho exones del gen SQSTM1.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
Cebador	Anillamiento	Extensión	Ciclos
1-Sentido	64°C	72°C	35
1-Anti-sentido	45seg	45seg	
2-Sentido	64°C	72°C	35
2-Anti-sentido	45seg	45seg	
3-Sentido	64°C	72°C	35
3-Anti-sentido	45seg	45seg	
4-Sentido	64°C	72°C	35
4-Anti-sentido	45seg	45seg	
5-Sentido	64°C	72°C	35
5-Anti-sentido	45seg	45seg	
6-Sentido	60°C	72°C	35
6-Anti-sentido	1min	1min	
7-Sentido	60°C	72°C	30
7-Anti-sentido	30seg	30seg	
8-Sentido	64°C	72°C	30
8-Anti-sentido	30seg	1min	

5.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% (*Gibco-BRL*) preparado con tampón TBE (Tris 0.044M, ácido bórico 0.044M, EDTA 1.0mM pH=8.3). El primer pocillo del gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño correspondiente con el DNA del fago X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. Este marcador genera fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.281, 0.271, 0,234, 0.194, 0.118 y 0.072 kb.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 120 voltios durante 30 minutos.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando *SYBR Safe DNA Gel Stain (1: 10000, Invitrogen)*, que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA emitiendo fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta (254 nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (*Kodak CD40*) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (*Kodak digital Science 1D*).

5.3 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR CON EXONUCLEASAS

Como resultado de la PCR, junto al producto amplificado se obtuvieron restos de los cebadores usados junto a dNTPs sobrantes. Tanto los cebadores como los dNTPs que quedan en exceso deben ser eliminados, para ello se procede a su digestión con una exonucleasa. La exonucleasa de uso se corresponde con la del kit *ExoSAP-IT* (*Affymetrix*).

Se añade 1 μ l de enzima por cada 5 μ l de PCR. El programa usado en el termociclador es el siguiente:

37°C durante 15 min

80°C durante 15 min

Finalizado este proceso la muestra ya esta en condiciones de ser secuenciada.

5.4 SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Cada muestra se preparó con el cebador sentido y con el cebador anti-sentido por separado en una concentración de 3 pmol de cebadores de secuenciación (tabla 5), en un volumen de 2 μ l y 40-60 ng de producto de PCR. El volumen final es de 8 μ l.

6- ESTUDIO POBLACIONAL MEDIANTE dHPLC

El estudio poblacional de las mutaciones p.E274D, p.R321C y p.A426V del gen SQSTM1 se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (dHPLC) en 100 alelos de individuos sanos. Se realizó utilizando el sistema WAVE® (Transgenomic, UK), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase reversa (210), acoplado al software de análisis (Navigator, Sistema WAVE, Transgenomic). Para ello, se amplificó mediante PCR la región de estudio del gen y los productos de PCR fueron desnaturizados y renaturalizados para permitir la formación de heterodúplex. Las muestras se inyectaron en la columna de dHPLC a una temperatura de desnaturización ajustada (tabla 7) y se eluyeron con acetato de trietilamonio (TEAA) a concentraciones crecientes de acetonitrilo. Los heterodúplex eluyen antes que los homodúplex gracias a que tienen una unión más débil a la matriz, debido a su configuración más abierta causada por el desapareamiento de bases. Todos los resultados obtenidos en el estudio mediante dHPLC fueron confirmados mediante secuenciación automática.

Tabla 7. Temperatura de desnaturalización para las mutaciones p.E274D, p.R321C y p.A426V.

Mutación	Temperatura de desnaturalización
p.E274D	54,4°C
p.R321C	61,6°C
p.A426V	58,6°C

7- ESTUDIOS “*IN-SILICO*” DE LA PATOGENICIDAD DE MUTACIONES

El análisis de la conservación interespecífica de las secuencias proteicas se llevó a cabo con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), introduciendo las secuencias a comparar en formato FASTA. El programa ClustalW permite el alineamiento de múltiples secuencias de DNA o proteínas, permitiendo ver las similitudes o diferencias entre las secuencias alineadas.

El estudio “*in silico*” de la posible patogenicidad de las mutaciones p.E274D, p.R321C y p.A426V del gen SQSTM1 se realizó mediante la utilización de diferentes programas bioinformáticos:

- PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)
- PMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)

8- CLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN

8.1- CLONACIÓN EN EL VECTOR pGEM-T® Easy

El cDNA del gen SQSTM1 fue clonado en el vector pGEM-T®Easy (Promega), constituido por una cadena doble de DNA lineal que permite ligar en sus extremos productos de PCR sin necesidad de que éstos sean manipulados previamente. Además, este vector ofrece la posibilidad de selección por color de los eventos de ligación, ya que el sitio de clonación interrumpe el operón Lac; y de selección de transformación, ya que contiene un gen de resistencia a ampicilina (Ampr) (Figura 14). Para la reacción de ligación se emplearon 50 ng del vector, 1U de ligasa T4 (Fermentas), Buffer de reacción 1X (30 mM Tris- HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 10% polietilenglicol, pH= 7,8), 60-100 µg de producto de PCR y hasta 10 µl de H₂O, y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente.

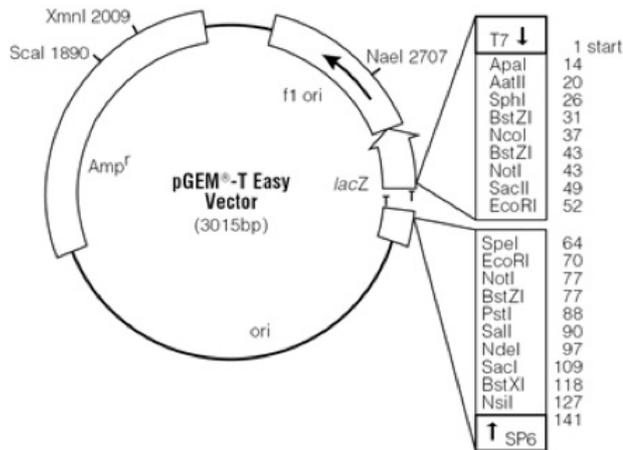


Figura 14. Representación del vector de clonación pGEM-T Easy

8.2- PREPARACIÓN DE CÉLULAS SUPERCOMPETENTES

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de la cepa bacteriana competente DH5 derivada de *E. coli*. Para ello, se sembró una colonia de esta cepa bacteriana en medio LB, y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO600 aproximada de 0.6. El cultivo se centrifugó a 1200g durante 10 min a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 100mL de CaCl₂ 100mM a 4°C y, tras una nueva centrifugación, las bacterias se resuspendieron en 10mL de CaCl₂ 100mM.

8.3- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS SUPERCOMPETENTES

Se incubaron 5 µL de la reacción de ligación con 30 µL del cultivo de bacterias competentes durante una hora en hielo. Pasado este tiempo, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 2 min tras el que se añadieron 300µL de LB, para proseguir con una incubación de la mezcla a 37°C durante 30 min. La bacteria transformada se sembró, junto con 50 µL de IPTG (20 mg/mL) (inductor de la transcripción del operón Lac) y 50 µL del sustrato XGal (20 mg/mL), en medio sólido preparado con 20 mg/mL de ampicilina para llevar a cabo la selección de transformación. Las placas de cultivo se incubaron en una estufa a 37°C durante 12-16 horas.

8.4- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE COLONIAS TRANSFORMADAS

Las colonias que no adquirieron color azul debido a que la clonación del inserto interrumpía la secuencia codificante del operón Lac presente en el vector pGEM®-T easy (Promega), se sembraron en 5 mL de LB suplementado con ampicilina. Los cultivos se dejaron crecer a 37°C en agitación constante durante 6-16 h. y se

centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm. Para el aislamiento de los plásmidos se utilizó el kit comercial PlasmidPrep (GeneDan) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se precipitaron con isopropanol y posteriormente fueron lavados con etanol al 70%. Después se dejaron secar y se resuspendieron en 20 µl de agua bi-destilada.

8.5 CLONACIÓN EN EL VECTOR pCEFL-FLAG

El cDNA del gen SQSTM1 que fue clonado en el vector pGEM®-T Easy, fue insertado en el vector de expresión pCEFL-Flag (Figura 15). Previamente, se digirieron tanto el vector pCEFL-Flag como la construcción en pGEM-T®Easy con la endonucleasa de restricción EcoRI, para lo que se emplearon 1U de la endonucleasa EcoRI, buffer Tango 1X (33mM Tris-acetato, 10mM Mg-acetato, 66mM K acetato, 0,1mg/ml BSA) y 2 µg de cada DNA y H2O hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó durante 3 horas a 37°C.

Los productos resultantes de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1% y recortados del mismo para su aislamiento y purificación. Se comprobó el resultado de la purificación con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La reacción de ligación entre el cDNA del gen SQSTM1 y el vector de expresión pCEFL-Flag se realizó empleando 50 ng de vector, 1U de Ligasa T4 (Fermentas), buffer de reacción 1X (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 10% polietilenglicol, pH= 7,8), 0,5mM de ATP y 60-100 ng de cDNA del gen SQSTM1. La reacción se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, esta reacción fue transformada en bacterias DH5.

Para comprobar la eficiencia de la ligación, los plásmidos obtenidos se digirieron con la enzima EcoRI. Los plásmidos que contenían inserto fueron secuenciados para su comprobación.

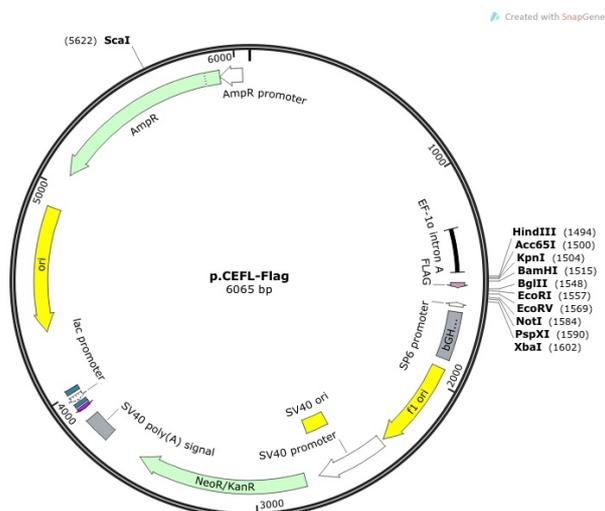


Figura 15. Representación del vector de clonación pCEFL-Flag

9- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite la introducción de mutaciones en puntos específicos conocidos. En nuestro caso, se realizaron dos construcciones diferentes introduciendo sobre la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1* el cambio G>C en la posición +1000 (p.E274D) para generar la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D* y el cambio C>T en la posición +1139 para generar la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C* (Figura 16).

Para el proceso de mutagénesis dirigida se utilizó el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), que consta de tres etapas: PCR sobre el plásmido silvestre utilizando cebadores que introducen la mutación deseada, digestión del DNA parental y transformación.

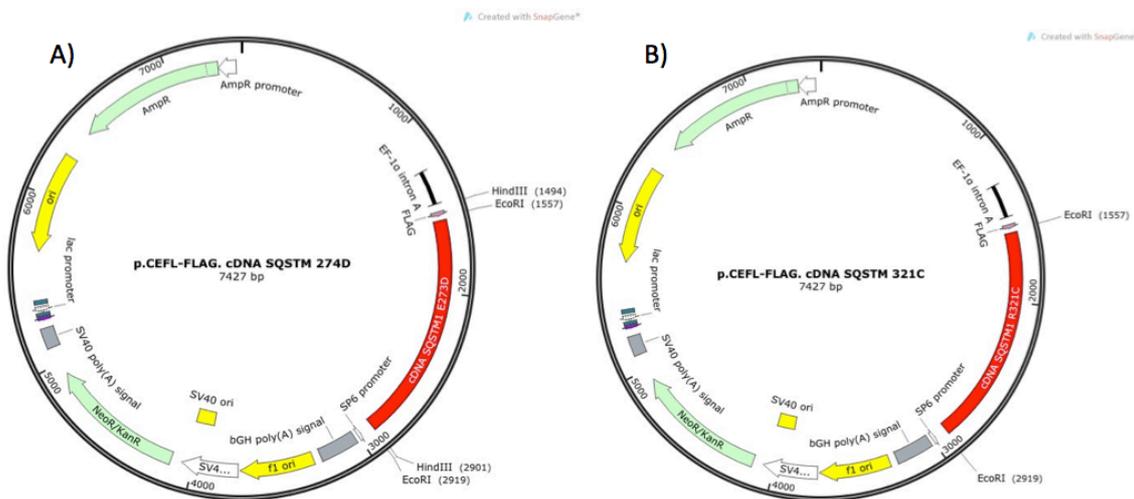


Figura 16. Representación de la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D* (A) y de la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C* (B).

9.1 PCR

Para la realización de la PCR, se utilizó como DNA de partida el cDNA del gen SQSTM1 silvestre, clonado en el vector pCEFL-Flag. Esta construcción creció y se aisló en bacterias *E.coli* de la cepa DH5 que metilan el DNA. Los cebadores utilizados para la mutagénesis fueron diseñados con el programa QuickChange® Primer Design (Stratagene), que permite el diseño de los cebadores óptimos para la realización de la mutagénesis (tabla 8).

Tabla 8. Secuencia de los cebadores necesarios para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de las mutaciones p.E274D y p.R321C.

CEBADORES PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE p.E274D	
Sentido	5'GAC-CCC-CGT-CTC-TCC-AGA-CAG-TTC-CAG-CA-3'
Anti-sentido	5'TG-CTG-GAA-CTG-TCT-GGA-GAG-ACG-GGA-GTC-3.
CEBADORES PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE p.R321C	
Sentido	5'GAG-TCC-GAG-GGG-TGC-CCT-GAG-GAA-C-3'
Anti-sentido	5'G-TTC-CTC-AGG-GCA-CCC-CTC-GGA-CTC-3'

El protocolo para la reacción de PCR fue el siguiente: 2,5µl de Buffer de reacción 10X, 50 ng de DNA molde (HNF1A-pCEFL), 10µM de cada uno de los cebadores, 200 µM de cada dNTPs y 0,5 µl Pfu Ultra HF (1,25 U/µl), en un volumen final de 25 µL.

El programa de amplificación que se utilizó para la mutagénesis de p.E273D fue:
95°C---30" (95°C---30" ; 65°C---1' ; 68°C---8')x 20 ciclos.

El programa de amplificación que se utilizó para la mutagénesis de p.R321C fue:
95°C---30" (95°C---30" ; 60°C---1' ; 68°C---8')x 20 ciclos.

9.2 DIGESTIÓN DE LA HEBRA PARENTAL CON LA ENZIMA DpnI

El producto de PCR fue digerido con la enzima DpnI, que reconoce DNA metilado; de esta manera, se elimina el DNA parental dejando intacta la construcción con la mutación. La digestión se realizó con 1µl de DpnI (10U/µl) y se incubó durante 1h a 37°C.

9.3 TRANSFORMACIÓN EN LAS BACTERIAS SUPERCOMPETENTES XL-1 BLUE

La transformación de la digestión anterior fue realizada en la cepa de células supercompetentes XL-1 Blue suministradas por el kit comercial. Para ello se utilizó una alícuota de 50 µl de bacteria y 1µl del producto de la digestión con DpnI. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y, posteriormente, se sometió a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Tras el choque térmico, la reacción se incubó durante 2 minutos en hielo, se añadió 500 µl de medio LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación (225 rpm). Finalmente, la mezcla se sembró en una placa de medio LB con ampicilina y se dejó crecer a 37°C durante 20 horas. Las colonias crecidas se sembraron en 5 ml de medio LB líquido durante 6 horas y la extracción de DNA plasmídico se realizó con el procedimiento ya descrito. Los plásmidos obtenidos se secuenciaron para su comprobación.

10- CULTIVOS CELULARES

10.1 LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea celular que se utilizó en este estudio fue COS-1 (código ATTC CRL1650). La línea celular COS-1 corresponde con fibroblastos de riñón de mono verde africano.

La línea celular COS-1 creció en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) (Lonza) suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal) y 1% de Penicilina/Estreptomicina a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂.

10.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR

Las células fueron recogidas de las placas de cultivo utilizando el reactivo TryPle 1X(Gibco) y se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante tres minutos. Tras lavar el precipitado celular con PBS se incubaron durante una hora con buffer de lisis a 4°C y en agitación (NaCl 140nM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20mM pH 8.0) al que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1mM, pepstatina 1µM, aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1µg/ml y orto vanadato sódico 1mM. Se recogieron los extractos celulares, se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 12000 r.p.m. y se transfirieron los sobrenadantes resultantes, que contienen la mezcla de proteínas, a un nuevo tubo Eppendorf. Todo el proceso se realizó a 4°C.

10.3 CONTAJE DE CÉLULAS

El conteo de células se llevó a cabo utilizando la cámara de Neubauer (figura 17), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\text{n}^\circ \text{ de células} \times 10.000) / \text{n}^\circ \text{ de cuadrantes}$$

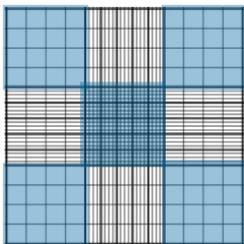


Figura 17. Detalle de los cuadrantes de la cámara Neubauer

11- TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

La transfección transitoria se llevó a cabo en el momento que las células COS1 alcanzaron el 70-80% de confluencia. La transfección se realizó con FuGene HD (Roche), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizó una proporción FuGene/plásmido de 3:1. Pasadas 48 horas de la transfección se llega al punto álgido de la expresión de las diferentes construcciones transfectadas en las células COS1.

Se transfectaron las construcciones *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1*, *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D* y *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C* para generar la línea celular COS1 que expresase la proteína p62 WT (células *COS1 WT*), que expresase la proteína p62 con la mutación p.E274D (células *COS1 274D*) y que expresase la proteína p62 con la mutación p.R321C (células *COS1 321C*) respectivamente.

12- MICROSCOPIA CONFOCAL E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Utilizamos la línea celular COS-1, que creció sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro. Cuando estas células alcanzaron una confluencia adecuada (80%), fueron transfectadas de manera transitoria con las construcciones *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1*, *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D* y *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C*. A las 48 horas de la transfección las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 15 min. A continuación se permeabilizaron con Tritón X-100 (Boehringer Mannheim) al 0,5% en PBS durante 10 min y se lavaron con PBS. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario necesario para la detección de las proteínas de interés (tabla 9); los anticuerpos primarios se prepararon en PBS con BSA (1mg/ml). El anticuerpo secundario se utilizó a una concentración de 1:400 en el mismo tampón que el anticuerpo primario (tabla 9). Para teñir los núcleos de las células, se incubaron los cristales con una dilución 1/10000 de DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) (Roche). Finalmente, las preparaciones fueron montadas sobre portaobjetos utilizando el reactivo Mowiol (Calbiochem).

Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio LEICA SP5 modelo DMI 6000B acoplado a un software informático LEICA LAS AF.

Tabla 9. Relación de los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia en este trabajo

Anticuerpo I	Concentración	Origen Anticuerpo I	Anticuerpo II
Anti-FLAG M2	1:1000	Mouse	Alexa Fluor 488
Anti-p62	1:100	Rabbit	Alexa Fluor 594
Anti-LC3	1:200	Rabbit	Alexa Fluor 594
Anti-Lamp1	1:100	Mouse	Alexa Fluor 488

13- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Los extractos proteicos se hirvieron en tampón de muestra de Laemmli (SPLB) durante 10 min, y a continuación se “resolvieron” en geles de poliacrilamida al 12% utilizando tampón de carrera conteniendo 0,25M Tris, 2M glicina y 0,5% SDS. Como marcador de peso molecular se utilizó *PageRuler™ Prestainer protein ladder plus* (Fermentas). A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de *PVDF Amersham Hybond™* utilizando un tampón de transferencia compuesto por 25mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol. Para verificar la eficiencia de la transferencia, las membranas fueron teñidas de manera reversible con solución Ponceau S (Sigma).

Para la inmunodetección, en primer lugar incubamos las membranas con 25mM Tris HCl pH=8, conteniendo 0,1% de Tween20 (Sigma) (TBST) y 5% de leche desnatada. Las membranas se mantuvieron en esta solución 1h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4° C. La hibridación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente o a 4° C toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados se describen la tabla 10. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios de la especificidad adecuada conjugados a peroxidasa (HRP) (Amersham Biosciences)(tabla 10). Después de cada incubación, las membranas se lavaron 3 veces en TBST durante 10 min. La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific).

Tabla 10. Relación de anticuerpos utilizados para Western Blot en este trabajo

Anticuerpo I	Concentración	Origen Anticuerpo I	Anticuerpo II (origen)	Concentración
Anti FLAG M2	1:1000	Mouse	Anti-Ms (Sheep)	1:10000
Anti NF-kB	1:200	Rabbit	Anti-Rb (Goat)	1:10000
Anti p62	1:2000	Rabbit	Anti-Rb (Goat)	1:10000
Anti LC3-II	1:2000	Rabbit	Anti-Rb (Goat)	1:10000
Anti β-actina	1:10000	Mouse	Anti-Ms (Sheep)	1:10000

14- INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células COS-1 fueron transfectadas de forma transitoria con FuGene HD (Roche). A las 48 horas de la transfección se obtuvo el extracto proteico total con tampón de lisis D (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, ROCHE). La concentración de proteínas se cuantificó usando el kit BioRad DC Protein Assay. Se bloqueó 1 mg de extracto total de proteína con microesferas de sefarosa unidas a proteína G (GammaBind™ G Sepharose™, GE Healthcare) durante una hora. El extracto bloqueado se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 2 horas en un orbital a 4°C (tabla 11). Los complejos formados por el anticuerpo y las

proteínas fueron capturados con nuevas microesferas de sefarosa unidas a proteína G durante una hora en rotación. Todo este proceso se realizó a 4 °C. Tras cinco lavados con tampón de lisis, las microesferas se hirvieron 10 minutos en 2X tampón de carga de proteínas Laemmli (SPLB) en un bloque térmico a 100°C. Finalmente, el 50% de cada muestra se resolvió en geles al 8% de poliacrilamida-SDS y fueron analizadas por Western Blot.

Como controles negativos de las inmunoprecipitaciones se utilizaron IgG de ratón o conejo (5 µg/1mg extracto proteico; ChromPure IgG de ratón 015 -000-003, ChomPure IgG de conejo 011-000-003, Jackson ImmunoResearch).

Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación en este trabajo

Anticuerpo I	Origen	Anticuerpo I	Anticuerpo II	Concentración
Anti-FLAG M2	Mouse		Anti-Ms (Sheep)	1:10000
Anti-LC3-II	Rabbit		Anti-Rb (Goat)	1:10000

15- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realiza con el programa informático SPSS (versión 21.0). Se consideró la existencia de significación estadística cuando se halló un p-valor menor de 0,05.

Para el análisis descriptivo de los datos, se calcula la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa y las variables cuantitativas se describen en términos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

En los estudios de asociación de polimorfismos y en el caso de variables clínicas cualitativas se analizó la distribución mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En aquellos casos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se realizó una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. En el estudio de las variables cuantitativas se aplicó un ANOVA en el caso de que los datos cumplieren igualdad de varianzas (homozasticidad) y siguiesen una distribución normal. En el caso de que las variables no cumplieren la igualdad de varianzas ni siguiesen una distribución normal se aplicó el test de Mann Whitney (2 muestras independientes) o el test de Kruskal-Wallis (K muestras independientes). La homozasticidad y la distribución de las muestras se comprobó con la aplicación del test de Levene y con la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov respectivamente.

El análisis estadístico de la medida de la longitud telomérica se realizó con el programa GenEX 5.3.6, adecuado para el análisis de datos de PCR cuantitativa a tiempo real comparativa relativa ya que permite realizar una corrección de las frecuencias de

Para comprobar la eficiencia de la ligación, los plásmidos obtenidos se digirieron con la enzima EcoRI. Los plásmidos que contenían inserto fueron secuenciados para su comprobación.

Finalmente se aisló el clon mutado junto con el promotor CAG y una cola polyA (*CAGpro-cDNASQSTM1.321C-beta globina pA*) mediante el uso de las enzimas de restricción SalI y PscI. La digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa y posteriormente se aisló la banda de agarosa que contenía el transgén. La elución de la banda se realizó con el kit NucleoSpin® Extract II Kit (Clontech) y como buffer de elución usamos una solución 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, previamente filtrada a través de membrana de 0.02 micrómetros. La concentración y pureza del transgén se midió en Nanodrop y a continuación se diluyó en buffer de microinyección 10 mM Tris, pH 7.4 0.1 mM EDTA a concentración 5 ng/μl.

El inserto *CAGpro-cDNASQSTM1.R321C-beta globina pA* se utilizó para inyectarlo en embriones de ratón en fase de una célula.

16.2- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES

La obtención de los embriones en fase de una célula se realizó sobre-estimulando hembras de la cepa donadora de 4 semanas de edad con hormonas gonadotropinas que mimetizan la acción de la hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH) obtenidas de la casa comercial Sigma (PMSG y HCG). Se inyectaron 5UI de hormona por hembra (9 hembras por sesión de microinyección) en un intervalo de 48h y a mitad del ciclo de luz (14:00 pm), primero la PMSG y después la HCG. Una vez inyectada la HCG las hembras se pusieron en cruce con machos de su misma cepa. Al día siguiente las hembras fertilizadas se sacrificaron para obtener sus embriones en fase de una célula. Los embriones fueron inyectados con el transgén purificado y posteriormente se mantuvieron en medio KSOM durante 12-16 horas a 37°C y 5% CO₂. Durante este tiempo los embriones manipulados eficazmente pasaron a estadio de 2 células.

16.3- IMPLANTACIÓN DE LOS EMBRIONES Y GESTACIÓN

El día en que se procedió a la manipulación genética de los embriones se cruzaron hembras CD1 de 8 semanas de edad con machos CD1 vasectomizados, con el objeto de obtener hembras pseudogestantes. Mediante la visualización del tapón vaginal pudimos identificar aquellas hembras que participaron en la cópula y por ende que estaban preparadas para acoger la gestación de los embriones manipulados. Los embriones en fase de dos células fueron lavados en medio M2 y transferidos al útero de las mismas en la zona SPF del animalario OMG, 20 embriones por hembra pseudogestante. Seguimos la gestación de las hembras realizando pesadas de las mismas 2 veces por semana. El

parto se produjo a los 20 días de gestación y las crías se mantuvieron con las madres 20 días más hasta su destete y marcaje.

16.4- IDENTIFICACIÓN DE LOS NUEVOS RATONES TRANSGÉNICOS

Aproximadamente nuestra eficacia en la técnica de transgénesis por microinyección fue de 1 transgénico por cada 10 animales nacidos vivos. Esto nos obligó a identificar aquellos ratones positivos, para lo cual el día del destete se marcaron y se obtuvo tejido de su cola. El tejido se disgregó mecánicamente en solución de lisis Tris pH 8.0 10mM EDTA pH 8.0 5mM NaCl 200mM SDS 0.2% y proteinasa K durante 12 horas a 55°C. A continuación se realizó una extracción clásica de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo, finalmente se resuspendió en TE. Este DNA genómico sirvió como molde para realizar un ensayo de PCR utilizando cebadores específicos para el transgén, lo que nos permitió identificar los ratones transgénicos fundadores de la nueva línea creada.

El programa de amplificación utilizado fue: [95°C 5' (95°C 30" , 60°C 45" y 72°C 45") x 35 ciclos, 72 °C 10']. Los cebadores utilizados fueron:

Genot ratón SQSTM1.R321C _{sentido} : 5' - TGG-TAA-TCG-TGC-GAG-AGG- 3'
Genot ratón SQSTM1.R321C _{anti-sentido} : 5' - GCT-GCA-GCA-GAA-GCT-GAA-3'

16.5- ESTABULACIÓN Y GENERACIÓN DE LA NUEVA COLONIA

Los fundadores se cruzaron con ratones de la cepa C57Bl6J y su descendencia se analizó, cómo se ha descrito anteriormente, para la detección de los animales positivos. Esta fue la generación F1, que contiene el transgén en heterocigosis y es la generación que se está utilizando en el estudio. Todos los animales se estabulan en el Animalario OMG de nuestra Institución, en RACKs ventilados, dentro de jaulas aisladas con filtro HEPA, 21-22°C de temperatura, ciclo de luz/oscuridad (12h) y condiciones SPF.

RESULTADOS



1- ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Para el estudio de la longitud telomérica en pacientes con EOP hemos analizado a 90 pacientes y 90 individuos sanos sin antecedentes de enfermedades óseas.

Los pacientes y los controles fueron pareados en edad, sexo y hábitos tabáquicos; factores importantes en el acortamiento de los telómeros. Las variables clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 12.

Tanto el grupo de pacientes como el de controles fue dividido en función de su edad: se formó un grupo integrado por individuos de entre 70 y 80 años y un segundo grupo por individuos con edades entre 40 y 60 años.

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con EOP utilizados en el estudio de la longitud telomérica

		Total de pacientes	Pacientes entre 70-80 años	Pacientes entre 40-60 años
Sexo	Hombre	49 (54,4%)	34 (56,6%)	15 (50,0%)
	Mujer	41 (45,6%)	26 (43,4%)	15 (50,0%)
Edad diagnóstico	Mayor de 60 años	60 (66,6 %)	60 (100%)	0 (0%)
	Menos de 60 años	30 (33,4%)	0 (0%)	30 (100%)
Hábitos tabáquicos	Si	16 (17,7%)	10 (16,6%)	6 (20,0%)
	No	74 (82,3%)	50 (83,4%)	24 (80,0%)
Historia familiar	Esporádico	70 (77,7%)	51 (85%)	19 (63,3%)
	Familiar	20 (22,3%)	9 (15%)	11 (37,7%)
Nº de huesos afectados	Menos de tres	59 (65,5%)	39 (65%)	20 (66,6%)
	Más de tres	31(34,5%)	21 (35%)	10 (33,4%)
Presencia de fracturas	Si	9 (10,0%)	5 (8,3%)	4 (13,3%)
	No	81(90,0%)	55 (91,7%)	26 (86,7%)
Afectación del cráneo	Si	33(36,6%)	20 (33,3%)	13 (43,3%)
	No	57(63,4%)	40 (66,7%)	17 (56,7%)
Afectación del VIII par craneal	Si	11 (12,3%)	5 (8,3%)	6 (20,0%)
	No	79 (87,7%)	55 (91,7%)	24 (80,0%)

En el estudio de la media de la longitud telomérica se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre pacientes y controles con edades comprendidas entre 40 y 60 años: los pacientes con EOP tienen una longitud telomérica más corta que los individuos sanos (tabla 13).

Tabla 13. Media de la longitud telomérica de cada uno de los grupos estudiados y el p-valor resultante de cada una de las comparaciones entre pacientes y controles

	Media de longitud telomérica	p-valor
Pacientes	5,1165	0,131
Controles	5,9430	
Pacientes entre 70 y 80 años	5,3717	0,950
Controles entre 70 y 80 años	5,5539	
Pacientes entre 40 y 60 años	4,6315	0,012
Controles entre 40 y 60 años	6,6825	

En el estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2293607 TERC y rs2735940 TERT no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes y los de controles (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencia genotípica de los polimorfismos TERT rs2735940 y TERC rs2293607 entre pacientes con EOP y controles

	SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor
Total de pacientes y controles	TERT rs2735940	TT	29 (32,2%)	25 (27,8%)	0,578
		TC	43 (47,8%)	50 (55,6%)	
		CC	18 (20,0%)	15 (16,7%)	
		TT+TC	72 (80,0%)	75 (83,3%)	0,563
		CC	18 (20,0%)	15 (16,7%)	
	TERC rs2293607	TT	29 (32,2%)	25 (27,8%)	0,515
		TC+CC	61 (67,8%)	65 (72,2%)	
		AA	9 (10,0%)	12 (13,3%)	
		AG	25 (27,8%)	30 (33,3%)	
		GG	56 (62,2%)	48 (53,3%)	
	AA+AG	34 (37,8%)	42 (46,7%)	0,227	
	GG	56 (62,2%)	48 (53,3%)		
	AA	9 (10,0%)	12 (13,3%)	0,486	
	AG+GG	81 (90,0%)	78 (86,7 %)		
	Pacientes y controles entre 70 y 80 años	TERT rs2735940	TT	19 (31,7%)	13 (21,7%)
TC			29 (48,3%)	37 (61,7%)	
CC			12 (20,0%)	10 (16,7%)	
TT+TC			48 (80,0%)	50 (83,3%)	0,637
CC			12 (20,0%)	10 (16,7%)	
TERC rs2293607		TT	19 (31,7%)	13 (21,7%)	0,215
		TC+CC	41 (68,3%)	47(78,3%)	
		AA	8 (13,3%)	11 (18,3%)	
		AG	15 (25,0%)	18 (30,0%)	
		GG	37 (61,7%)	31 (51,7%)	
	AA+AG	23 (28,3%)	29 (48,3%)	0,269	
	GG	37 (61,7%)	31 (51,7%)		
	AA	8 (13,3%)	11 (18,3%)	0,453	
	AG+GG	52 (86,7%)	49 (81,7%)		
	Pacientes y controles entre 40-60 años	TERT rs2735940	TT	10 (33,3%)	12 (40,0%)
TC			14 (46,7%)	13 (43,4%)	
CC			6 (20,0%)	5 (16,7%)	
TT+TC			25 (80,0%)	25 (83,3%)	0,739
CC			6 (20,0%)	5 (16,7%)	
TERC rs2293607		TT	10 (33,3%)	12 (40,0%)	0,592
		TC+CC	20 (66,7%)	18 (60%)	
		AA	1 (3,3%)	1 (3,3%)	
		AG	10 (33,3%)	12 (40,0%)	
		GG	19 (63,3%)	17 (56,7%)	
	AA+AG	11 (36,7%)	13 (43,3%)	0,598	
	GG	19 (63,3%)	17 (56,7%)		
	AA	1 (3,3%)	1 (3,3%)	1,000	
	AG+GG	29 (96,7%)	29 (96,7%)		

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las características clínicas de los pacientes frente a la variabilidad de los genes TERT y TERC, ni frente a la longitud telomérica.

2- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

2.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA DETOXIFICACIÓN CELULAR: GSTM1, GSTT1 Y GSTP1

Para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 hemos analizado un total de 148 pacientes con diagnóstico probado de EOP y a 207 controles sin antecedentes de enfermedades óseas y pareados en edad y sexo con el grupo de pacientes. Las características clínicas de los pacientes están recogidas en la tabla 15.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes utilizados en el estudio de asociación de polimorfismos de genes implicados en detoxificación celular: GSTM1, GSTT1 y GSTP1.

		Pacientes con EOP
Sexo	Hombre	79 (53,37%)
	Mujer	69 (46,62%)
Edad diagnóstico	Mayor de 60 años	115 (77,70%)
	Menos de 60 años	33 (22,29%)
Historia familiar	Esporádico	129 (87,16 %)
	Familiar	19 (12,83%)
Nº de huesos afectados	Menos de tres	103 (69,59%)
	Más de tres	45 (30,40%)
Presencia de fracturas	Si	9 (6,08%)
	No	139 (93,92%)
Afectación del cráneo	Si	61 (41,21 %)
	No	87 (58,79%)
Afectación del VIII par craneal	Si	25 (16,89%)
	No	123 (83,11%)

Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la presencia-ausencia del gen GSTM1; ser portador del gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP ($p=0,011$, $OR=0,56$, $IC (95\%) = 0,36-0,87$). En el estudio de los genes GSTT1 y GSTP1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y los controles (tabla 16).

Tabla 16. Distribución de los genotipos estudiados en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 y su asociación con el riesgo a desarrollar EOP.

SNP	Genotipo	Pacientes EOP	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
GSTM1	-/-	98 (66,2%)	109 (52,7%)		1,00
	+/+ ; +/-	50 (33,8 %)	98 (47,3%)	0,011	0,56(0,36-0,87)
GSTT1	-/-	28 (18,9%)	49 (23,7%)	0,299	
	+/+ ; +/-	120 (81,1%)	158 (76,3%)		
	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,280	
	AG	65 (43,9)	97 (49,7%)		
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
GSTP1	AA+AG	135 (91,2%)	173 (88,7%)	0,477	
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,125	
	AG+GG	78 (52,7%)	119 (61,0%)		

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las características clínicas de los pacientes con EOP frente a la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1.

2.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DEL OSTEOCLASTO: VAV3

Para el estudio del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153 se analizaron 238 pacientes con diagnóstico probado de EOP y 253 individuos sin antecedentes de enfermedades óseas y pareados en edad y sexo con el grupo de pacientes.

Las características clínicas de los pacientes utilizados para el estudio de asociación del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153 están recogidas en la tabla 17.

Tabla 17. Características clínicas de los pacientes con EOP utilizados en el estudio de asociación del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153.

		Pacientes con EOP
Sexo	Hombre	132 (55,46%)
	Mujer	106 (44,54%)
Edad diagnóstico	Mayor de 60 años	188 (78,99%)
	Menos de 60 años	50 (21,01)
Historia familiar	Esporádico	213 (89,49%)
	Familiar	25 (10,51%)
Nº de huesos afectados	Menos de tres	177 (74,36%)
	Más de tres	61 (25,64%)
Presencia de fracturas	Si	17 (7,14%)
	No	221 (92,86%)
Afectación del cráneo	Si	90 (37,81%)
	No	148 (62,19%)
Afectación del VIII par craneal	Si	33 (13,86 %)
	No	205 (86,14%)

En el estudio del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153 hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica entre pacientes con EOP y controles. Ser portador del genotipo TT del polimorfismo VAV3 rs7528153 se asoció con un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad. Los estudios de codominancia confirmaron este resultado. También se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica, ser portador del alelo T del polimorfismo VAV3 rs7528153 aumenta el riesgo a desarrollar EOP (tabla 18).

Tabla 18. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo VAV3 rs7528153.

	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
Genotipo				
AA	95 (39,9%)	131 (51.8%)		1.00
AT	95 (39,9%)	101 (39.9%)	0,186	1,29 (0,88-1,90)
TT	48 (20,2%)	21 (8.3%)	<0,001	3,15 (1,77- 5,61)
AA+AT	190 (79,8%)	232 (91.7%)		1.00
TT	48 (20,2%)	21 (8.3%)	<0,001	2,79 (1,61-4,82)
AA	95 (39,9%)	131 (51.8%)		1.00
AT+TT	143 (60,1%)	122 (48.2 %)	0,009	1,61 (1,13-2,31)
Alelos				
A	285 (59,9 %)	363 (71.7%)		1.00
T	191 (40,1%)	143 (28.3%)	<0,001	1,70 (1,30-2,22)

En el estudio del polimorfismo VAV3 rs7528153 frente a las variables clínicas de los pacientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica en función de la historia familiar y del número de huesos afectados.

Ser portador del genotipo TT se asoció con pacientes con EOP de carácter familiar (tabla 19).

Tabla 19. Distribución genotípica y alélica entre pacientes de carácter esporádico y pacientes de carácter familiar en el estudio del polimorfismo VAV3 rs7528153.

	Pacientes EOP esporádico	Pacientes EOP familiares	p-valor	OR (IC=95%)
Genotipo				
AA	91(42,7%)	4 (16%)		1.00
AT	82(38,5%)	13 (52%)	0,030	3,60 (1,13-11,50)
TT	40(18,8%)	8 (32%)	0,018	4,55 (1,29-15,98)
AA+AT	173 (81,2%)	17 (68%)		
TT	40(18,8%)	8 (32%)	0,125	
AA	91(42,7%)	4 (16%)		1.00
AT+TT	122 (57,3%)	21 (84%)	0,015	3,91 (1,29-11,80)
Alelos				
A	264 (62%)	21 (42 %)		1.00
T	162 (38 %)	29 (58 %)	0,008	2,25 (1,24-4,07)

Para corroborar la asociación entre el genotipo TT y pacientes con EOP de carácter familiar se analizó a los pacientes con antecedentes familiares y a los pacientes de carácter esporádico, por separado, frente a controles; el genotipo TT se asoció con los pacientes de carácter familiar con más “fuerza” (OR más elevado) que con los pacientes de carácter esporádico (tabla 20).

Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo VAV3 rs7528253 en el grupo de pacientes en función de su *historia familiar*.

	Pacientes EOP familiares	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
Genotipo				
AA	4 (16%)	131 (51.8%)		1.00
AT	13 (52 %)	101 (39.9%)	0,015	4,18 (1,38 - 13,21)
TT	8 (32%)	21 (8.3%)	<0,001	12,30(3,40 - 44,70)
AA+AT	17 (68,0%)	232 (91.7%)		1.00
TT	8 (32%)	21 (8.3%)	0,001	5,17 (1,99-13,40)
AA	4 (16%)	131 (51.8%)		1,00
AT+TT	21 (84,0%)	122 (48.2 %)	0,002	5,59 (1,86-16,76)
Alelos				
A	21 (42,0 %)	363 (71.7%)		1,00
T	29 (58,0 %)	143 (28.3%)	<0,001	3,50 (1,93-6,34)
Pacientes EOP esporádicos				
Genotipo				
AA	91 (42,7%)	131 (51.8%)		1.00
AT	82 (38,5%)	101 (39.9%)	0,463	1,16 (0,78-1,72)
TT	40 (18,8%)	21 (8.3%)	0,001	2,72 (1,50-4,92)
AA+AT	173 (81,2%)	232 (91.7%)		1.00
TT	40 (18,8%)	21 (8.3%)	0,001	2,54 (1,44-4,46)
AA	91 (42,7%)	131 (51.8%)		1.00
AT+TT	122 (57,3%)	122 (48.2 %)	0,057	1,42 (0,99-2,06)
Alelos				
A	264 (62,0%)	363 (71.7%)		1.00
T	162 (38,0 %)	143 (28.3%)	0,002	1,55 (1,18-2,05)

En el estudio de la distribución genotípica en función del número de huesos afectados se encontraron diferencias estadísticamente significativas; el genotipo TT del polimorfismo VAV3 rs7528153 se asoció con pacientes que tenían menos de tres huesos afectados (tabla 21).

Tabla 21. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo VAV3 rs7528253 en el grupo de pacientes en función del número de huesos afectados.

	Pacientes con más de tres huesos afectados	Pacientes con menos de tres huesos afectados	p-valor	OR (IC=95%)
Genotipo				
AA	31 (50,8%)	64 (36,2%)		1.00
AT	24 (39,3%)	71 (40,1%)	0,083	2,36 (0,89-6,25)
TT	6 (9,8%)	42 (23,7%)	0,012	3,39 (1,30-8,80)
<hr/>				
AA+AT	55 (90,2%)	135 (76,3%)		1.00
TT	6 (9,8%)	42 (23,7%)	0,024	2,85 (1,14-7,09)
<hr/>				
AA	31 (50,8%)	64 (36,2%)		1.00
AT+TT	30 (49,2%)	113 (63,8%)	0,045	1,82 (1,01-3,28)
<hr/>				
Alelos				
A	86 (70,5%)	199 (56,2%)		1.00
T	36 (29,5%)	155 (43,8%)	0,006	1,86 (1,19-2,89)

2.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA AUTOFAGIA: ATG2B, ATG5, ATG10 Y ATG16L1

Para el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 se analizaron 238 pacientes con diagnóstico probado de EOP y 264 individuos sin antecedentes de enfermedades óseas y pareados en edad y sexo con el grupo de pacientes.

Los pacientes que se han analizado en el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 son los mismos que se usaron en el estudio de asociación del polimorfismo del gen VAV3 rs7528153, por lo tanto, la tabla en la que se recogen sus variables clínicas corresponde con la descrita en el apartado anterior (tabla 17).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo ATG2B rs3759601 entre pacientes con EOP y controles.

No obstante se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de los polimorfismos ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214. En el caso del polimorfismo ATG10 rs1864183, ser portador del alelo T supone una disminución del riesgo a padecer la enfermedad. El genotipo TC y CC del polimorfismo ATG16L1 rs2241880 se asoció con un aumento del riesgo a desarrollar EOP. Por último; el estudio de co-dominancia recesiva nos mostró que ser portador del alelo G (genotipos CG+GG) del polimorfismo ATG5 rs2245214 confiere un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (tabla 22).

Tabla 22. Distribución genotípica entre pacientes y controles en el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214

SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
ATG2B rs3759601	CC	90 (37,8%)	110 (41,7%)	0,276	
	CG	120 (50,5%)	115 (43,6 %)		
	GG	28 (11,8%)	39 (14,8 %)		
	CC+CG	210 (88,2 %)	225 (85,2 %)	0,322	
	GG	28 (11,8 %)	39 (14,8 %)		
		CC	90 (37,8%)	110 (41,7 %)	0,379
	CG+GG	148 (62,2%)	154 (58,3 %)		
ATG10 rs1864183	CC	100 (42%)	68 (25,8%)	/	1.00
	CT	107 (45%)	151(57,2 %)	<0,001	0,48 (0,32-0,71)
	TT	31 (13%)	45(17,0%)	0,007	0,46 (0,27-0,81)
	CC+CT	207 (87,0%)	219 (83,0%)	0,211	
	TT	31 (13,0%)	45 (17,0%)		
	CC	100 (42%)	68 (25,8%)	/	1.00
	CT+TT	138 (58 %)	196 (74,2%)	<0,001	0,47 (0,32-0,69)
ATG16L1 rs2241880	TT	40 (16,8%)	63 (23,9%)	/	1.00
	TC	110 (46,2%)	138 (53,3%)	0,342	1,25 (0,78-2,00)
	CC	88 (37,0%)	63 (23,9 %)	0,003	2,20 (1,31-3,66)
	TT+TC	150 (63%)	201 (76,1%)	/	1.00
	CC	88 (37%)	63 (23,9 %)	0,001	1,87 (1,27-2,75)
		TT	40 (16,8%)	63 (23,9%)	0,052
	TC+CC	198 (83,2%)	201 (76,1%)		
ATG5 rs2245214	CC	74 (31,1%)	106 (40,2%)	0,094	
	CG	128 (53,8%)	127 (48,1%)		
	GG	36 (13,1%)	31 (11,7%)		
	CC+CG	202 (84,9%)	233 (88,3%)	0,267	
	GG	36 (15,1%)	31 (11,7%)		
		CC	74 (31,1 %)	106 (40,2%)	/
	CG+GG	164 (68,9%)	158 (59,8%)	0,035	1,48 (1,02- 2,15)

Las frecuencias alélicas resultantes del estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 están recogidas en la tabla 19. En el estudio del polimorfismo ATG2B rs3759601 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el análisis de los polimorfismos ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Ser portador del alelo T del polimorfismo ATG10 rs1864183 se relacionó con una disminución del riesgo de desarrollar EOP. El alelo C del polimorfismo ATG16L1 rs2241880 y el alelo G del

polimorfismo ATG5 rs2245214, se asociaron con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (tabla 23).

Tabla 23. Distribución de las frecuencias alélicas entre pacientes y controles de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214.

SNP	Alelos	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
ATG2B	C	300 (63,0 %)	335 (49,7%)	0,890	
rs3759601	G	176 (37,0%)	193 (49,0%)		
ATG10	C	307 (64,5%)	287 (54,4%)	/	1,00
rs1864183	T	169 (35,5%)	241 (45,6%)	0,001	0,65 (0,50- 0,84)
ATG16L1	T	190 (39,9%)	264 (50,0%)	/	1,00
rs2241880	C	286 (60,1%)	264 (50,0%)	0,001	1,50 (1,17- 1,93)
ATG5	C	276 (58%)	339 (64,2%)	/	1,00
rs2245214	G	200 (42%)	189 (35,8%)	0,044	1,30 (1,10-1,67)

El estudio conjunto de los polimorfismos ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 mostró que ser portador del alelo C del polimorfismo ATG16L1 rs2241880 y del alelo G del polimorfismo ATG5 rs2245214 conjuntamente, aumenta significativamente el riesgo de desarrollar EOP (tabla 24).

Tabla 24. Distribución alélica entre pacientes y controles resultado del estudio conjunto de los polimorfismos ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214.

SNP	Alelos	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC=95%)
ATG16L1/ATG5	T/C	105 (44,1%)	146 (53,3%)	/	1,00
ATG16L1/ATG5	C/G	133 (53,9%)	118 (44,7%)	0,013	1,56 (1,10-2,23)

En el estudio de la distribución genotípica de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 respecto a las diferentes características clínicas de los pacientes con EOP, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

3-ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET. ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 310 pacientes con EOP. Del total, 53 pacientes (17,15%) tenían antecedentes familiares (forman parte de 32 familias diferentes) y 257 pacientes (82,9%) eran de carácter esporádico. En la tabla 25 se recogen las variables clínicas de nuestra cohorte de pacientes.

Tabla 25. Características clínicas de los pacientes con EOP incluidos en el estudio molecular del gen SQSTM1.

Características clínicas	Resultados
Sexo masculino, n (%)	136 (43,9%)
Edad de diagnóstico, media (DS)	67,77 (11,85)
Afectación polioestótica, n (%)	190 (61,3%)
Número de huesos afectados, media (DS)	2,72 (2,11)
Índice de Renier, media (SD)	15,90 (12,18)
Número de veces que la FA supera el límite, media (DS)	3,87 (5,57)
Pacientes con EOP activa, n (%)	248 (80%)
Pacientes de carácter familiar, n (%)	53 (17,1%)
Pacientes con fracturas o fisuras, n (%)	19 (6,1%)
Pacientes con coxopatía, n (%)	32 (10,3%)
Pacientes con afectación del par craneal, n (%)	31 (10%)
Pacientes que se han sometido a tratamiento, n (%)	214 (69,0%)

En los 53 pacientes familiares, pertenecientes a 32 familias, se llevó a cabo el estudio de los ocho exones del gen SQSTM1.

Nuestros resultados muestran que 18 pacientes con antecedentes familiares (34,0%) eran portadores de mutación en el gen SQSTM1, estos 18 pacientes forman parte de 14 familias diferentes. Un total de 17 familiares eran portadores de mutación en el gen SQSTM1 pero no desarrollan EOP (la media de edad de estos familiares es de 42,6 años, con un rango de 16 a 56 años). 3 pacientes formaban parte de familias con mutación pero no eran portadores de la mutación familiar en el gen SQSTM1 a pesar de desarrollar la enfermedad.

En 18 familias no hemos encontrado ningún paciente con EOP portador de mutación en el gen SQSTM1 (56,25%).

En 14 familias hay al menos un paciente portador de mutación en el gen SQSTM1 (43,75%) ; en 3 de ellas hay más de un paciente portador de mutación en el gen SQSTM1. En 11 familias sólo hay un paciente portador de mutación, en 7 de estas 11 familias hay al menos un paciente al que no se le ha podido llevar a cabo el estudio molecular del gen SQSTM1 y en 4 familias el “*propositus*” es el portador de mutación en SQSTM1 pero tiene descendencia con mutación en SQSTM1 que no ha desarrollado la enfermedad (la media de edad de estos familiares es de 43,16 años, con un rango de

29 a 55 años). La familia 6 es un ejemplo de la variedad descrita en la EOP familiar (Figura 19).

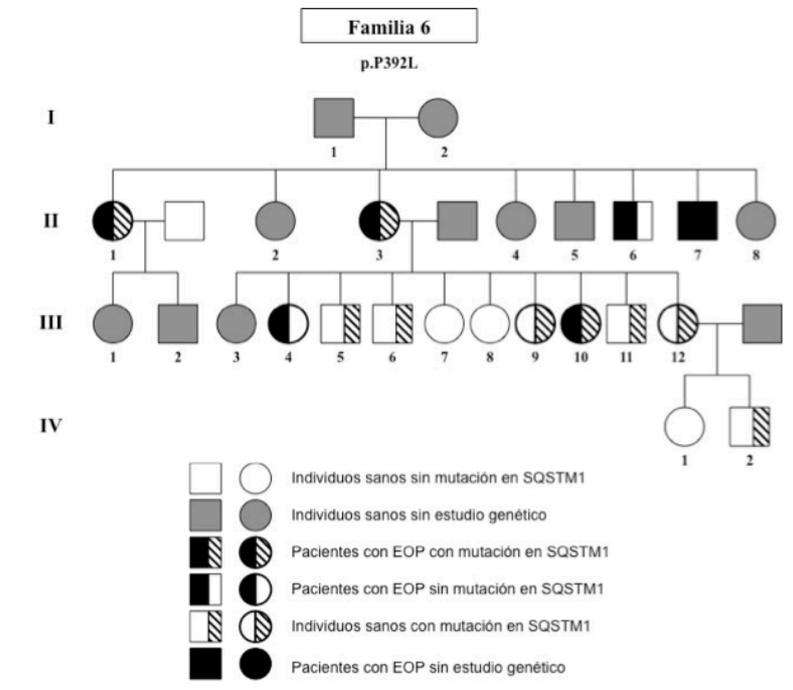


Figura 19. Árbol genealógico de la familia 6.

18 pacientes con antecedentes familiares eran portadores de mutación en el gen SQSTM1: 12 pacientes (66,7%) eran portadores de la mutación p.P392L, 3 pacientes (16,7%) de la mutación p.E274D, un paciente (5,6%) de la mutación p.M404T, un paciente (5,6%) de la mutación p.R321C y un paciente (5,6%) de la mutación p.A426V (tabla 26).

En los 257 pacientes de carácter esporádico se estudiaron los exones 6, 7 y 8 del gen SQSTM1. Nuestros resultados muestran que 12 pacientes esporádicos (4,7%) eran portadores de mutación en el gen SQSTM1: 8 pacientes (66,7%) eran portadores de la mutación p.P392L, 2 pacientes de la mutación p.R321C (16,7%) y dos pacientes eran portadores de la mutación p.E274D (tabla 26).

Las mutaciones p.E274D y p.R321C están localizadas en el exón 6 del gen SQSTM1 mientras que las mutaciones p.P392L, p.M404T y p.A426V están localizadas en el exón 8. No hemos encontrado ningún paciente portador de mutación en el exón 7 del gen SQSTM1.

Resultados

Tabla 26. Características clínicas de los pacientes portadores de mutación en el gen SQSTM1.

Mutación	Paciente	Sexo	Edad de diagnóstico	Nº de huesos afectados	Índice de Renier	Nº de veces que se eleva la FA	Historia familiar	Fracturas o fisuras	Coxopatía	Afectación del VIII par craneal
p.P392L	Paciente 1	H	65	2	21,5	2,5	Si	No	No	Si
	Paciente 2	H	64	7	46,3	4,48	Si	No	No	Si
	Paciente 3	M	49	4	22,5	39,43	Si	No	No	No
	Paciente 4	M	58	2	9,5	2,17	Si	No	Si	No
	Paciente 5	M	60	2	9,5	1,6	Si	No	No	No
	Paciente 6	M	43	3	17,5	2,73	Si	No	No	No
	Paciente 7	M	54	1	3,5	4,58	Si	No	No	No
	Paciente 8	H	54	1	4,5	3,71	Si	No	No	No
	Paciente 9	H	76	7	25,3	3,24	Si	No	No	No
	Paciente 10	H	79	5	24,3	1,16	Si	No	Si	No
	Paciente 11	H	66	6	36,0	1,94	Si	Si	No	No
	Paciente 12	H	53	1	3,3	0	Si	No	No	Si
	Paciente 13	H	62	6	27,8	1,39	No	No	No	No
	Paciente 14	H	64	5	17,7	3,76	No	No	Yes	No
	Paciente 15	H	48	2	2,0	20,8	No	No	No	No
	Paciente 16	M	66	10	58,3	1,75	No	No	No	No
	Paciente 17	M	51	1	4,5	4,72	No	No	No	No
	Paciente 18	H	73	4	28,5	0	No	No	Si	No
	Paciente 19	H	63	5	29,5	2,40	No	No	No	No
	Paciente 20	H	59	9	46,5	3,94	No	No	No	No
p.E273D	Paciente 21	H	57	1	5,0	0	Si	No	No	No
	Paciente 22	H	68	1	4,5	1,97	Si	No	No	No
	Paciente 23	H	61	2	7,8	2,45	Si	No	No	No
	Paciente 24	M	80	3	17,7	1,94	No	No	No	No
	Paciente 25	H	68	5	13,8	2,52	No	No	Si	No
p.M404T	Paciente 26	H	42	2	20,3	1,84	Si	No	No	Si
p.A426V	Paciente 27	M	58	1	4,5	2,68	Si	Si	No	No
p.R321C	Paciente 28	M	67	1	4,5	1,22	Si	No	No	No
	Paciente 29	M	70	3	12,8	12,8	No	No	No	No
	Paciente 30	M	72	3	13,5	13,5	No	Si	No	No

En el estudio de las posibles correlaciones entre el genotipo y las manifestaciones clínicas de los pacientes, nuestros resultados mostraron que los pacientes portadores de mutación en el gen SQSTM1 eran diagnosticados antes y tenían un mayor número de huesos afectados que los pacientes con EOP sin mutación (tabla 27).

Por otra parte, también se observó relación entre los pacientes que tienen antecedentes familiares y el ser portador de mutación en el gen SQSTM1 (tabla 27).

Tabla 27. Análisis de las características clínicas de los pacientes con EOP en función del estudio molecular del gen SQSTM1.

	Edad diagnóstico, media (DS)	Nº de huesos afectados, media (DS)	Índice de Renier, media (DS)	Nº de veces que la FA se eleva, media (DS)
SQSTM1 no mutado	68,53 (11,58)	2,64 (2,05)	15,67 (11,91)	3,83 (5,34)
SQSTM1 mutado	60,72 (12,22)	3,47 (2,54)	18,09 (14,51)	4,24 (7,47)
p-valor	0,001	0,041	0,302	0,700

	Pacientes EOP esporádicos	Pacientes EOP familiares	p-valor	OR (IC=95%)
SQSTM1 no mutado	245 (95,3%)	35 (66,0%)		1,00
SQSTM1 mutado	12 (4,7%)	18 (34,0%)	<0,001	10,50 (4,66-23,64)

4- CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Nuestros resultados mostraron que cinco pacientes con EOP eran portadores de la mutación p.E274D, tres pacientes eran portadores de la mutación p.R321C y un paciente lo era de la mutación p.A4126V.

Hasta ahora, ninguna de las tres mutaciones ha sido descrita en pacientes con EOP.

4.1 MUTACIÓN p.E274D.

La variante p.E274D es consecuencia de la mutación g.1000G>C. Se localiza en la parte del exón 6 del gen SQSTM1 que codifica el primer dominio PEST de la proteína p62.

El resultado del estudio “*in silico*” nos mostró que los tres programas bioinformáticos usados (Sift, pMUT y Polyphen) categorizan a la variante p.E274D como una mutación *neutral*. El estudio de conservación aminoacídica inter-especies nos mostró que el aminoácido E no está conservado (figura 20).

Query	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSS -- TEEKSSSQPSSCCSEPSKG
<i>Aedes aegypti</i> (<i>Culex aegypti</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSS -- TEEKSSSQPSSCCSEPSKG
<i>Bos taurus</i> (Bovine)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Branchiostoma floridae</i> (<i>Amphioxus</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Cricetulus griseus</i> (<i>Chinese hamster</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Heterocephalus glaber</i> (<i>Naked rat</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Homo sapiens</i> (Human)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSSQPSSCCSDPSKP
<i>Drosophila melanogaster</i>	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Xenopus tropicalis</i> (<i>Silurana tropicalis</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Myotis lucifugus</i> (<i>Little brown bat</i>)	VLKNEGMAEKGLVSL S RASH- -FRAGRSVECVTCCSCPFSG
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (<i>Giant panda</i>)	DIDVEHGGKRSRLTP T TP E SSSTGTEDKSGTQPSSCCSEVSKP
<i>Loxodonta africana</i> (<i>African elephant</i>)	VIHFEHG - - - LLMAFT S DFVEGWVTDVALRLLNMCC-----
<i>Cavia porcellus</i> (<i>Guinea pig</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP E SSG -- TKDKGSSQPSSCCSEPSPP
<i>Equus caballus</i> (<i>Horse</i>)	DIDVEHGGKRSRLTPVSP G SSS -- TEEKSSOPSSCCSDPNKP

Figura 20. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.E274D.

Se realizó un estudio poblacional, mediante dHPLC, en 50 individuos sanos y sin antecedentes de enfermedades óseas; en ninguno de ellos se encontró la variante p.E274D.

Mediante un ensayo de inmunofluorescencia no se detectaron diferencias en la localización de la proteína p62 entre las células *COS1 WT*, transfectadas con la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1*, y las células *COS1 274D*, transfectadas con la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.274D* (figura 21).

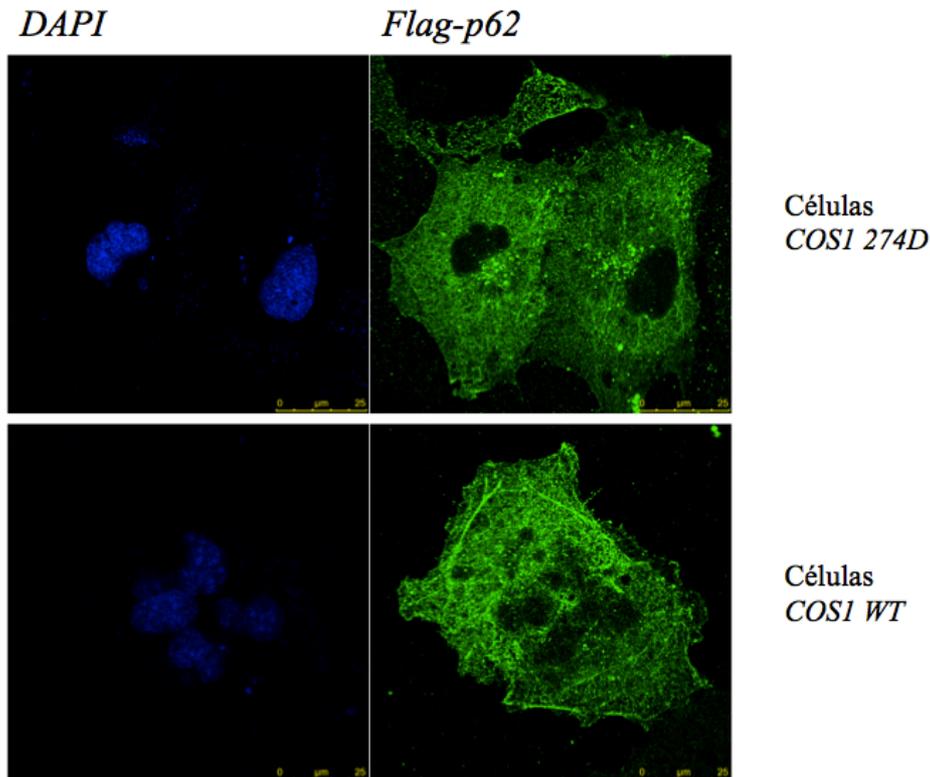


Figura 21. Ensayo de inmunofluorescencia en células *COS1 WT* y células *COS1 E274D*.

Se llevó a cabo un Western Blot para analizar la expresión a lo largo del tiempo de las proteínas p62 y NF-κB en las células *COS1 WT* y células *COS1 274D*. No se encontraron diferencias en la expresión de las proteínas (figura 22).

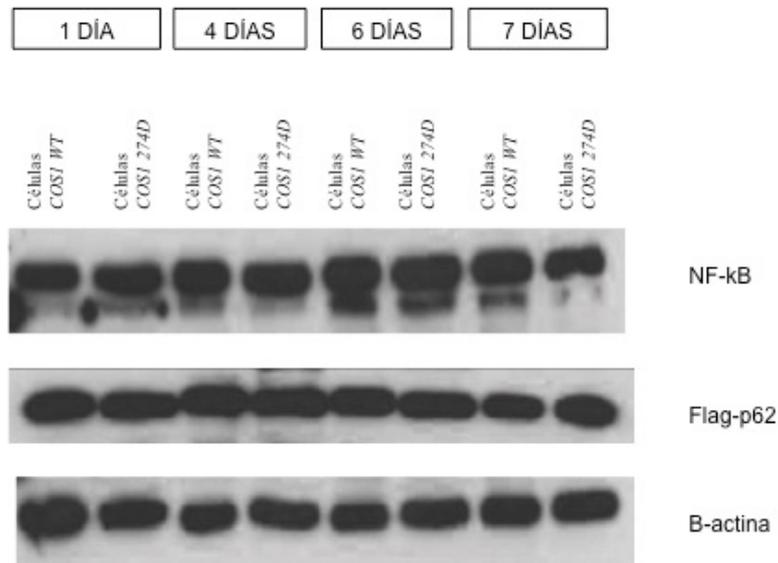


Figura 22. Expresión de las proteínas p62 y NF-κB en células *COS1 WT* y en células *COS1 274D*

4.2 MUTACIÓN p.A426V

La mutación p.A426V se origina como consecuencia de la variante g.1459T>C. Se localiza en el exón 8 del gen SQSTM1 que codifica al dominio UBA de la proteína p62.

Los programas bioinformáticos Polyphen y pMUT caracterizaron a la mutación como *patogénica*, el programa Sift la clasificó como una mutación *neutral*. El estudio de conservación aminoacídica inter-especies nos mostró que el aminoácido A está muy conservado (figura 23).

Query	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Aedes aegypti</i> (<i>Culex aegypti</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Bos taurus</i> (Bovine)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Branchiostoma floridae</i> (<i>Amphioxus</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Cricetulus griseus</i> (<i>Chinese hamster</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Heterocephalus glaber</i> (<i>Naked rat</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Homo sapiens</i> (Human)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Drosophila melanogaster</i>	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Xenopus tropicalis</i> (<i>Silurana tropicalis</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Myotis lucifugus</i> (<i>Little brown bat</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (<i>Giant panda</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Loxodonta africana</i> (<i>African elephant</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Cavia porcellus</i> (<i>Guinea pig</i>)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP
<i>Equus caballus</i> (Horse)	DEGGWLTRLLQTKNYDIGAALDTIQYSKHPP

Figura 23. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.A426V.

Se realizó un estudio poblacional, mediante dHPLC, en 50 individuos sanos y sin antecedentes de enfermedades óseas localizándose cuatro controles portadores de la variante p.A426V.

4.3 MUTACIÓN p.R321C

La mutación p.R321C se origina como consecuencia de la variante g.1139C>T; se localiza en la parte del exón 6 del gen SQSTM1 que codifica al dominio LIR de la proteína p62.

Los programas bioinformáticos Polyphen y pMUT caracterizaron a la mutación como *patogénica*, el programa Sift la clasificó como una mutación *neutral*. El estudio de conservación aminoacídica inter-especies nos mostró que el aminoácido R no está conservado, siendo el aminoácido Q el presente en la mayoría de las especies, el aminoácido C no aparece en ninguna especie (figura 24).

Query	TQSLAEQMRKIALES—EG— R ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	AQCLVEQMRKIALES—GV— Q ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	AQSLAEQMKKIALET—GA— Q ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Aedes aegypti</i> (<i>Culex aegypti</i>)	AQSLAEQMKKIALET—GA— Q ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Bos taurus</i> (Bovine)	AQSLTEQMNKIALES—GG— Q ----HEEQ----MESD-NCSG
<i>Branchiostoma floridae</i> (<i>Amphioxus</i>)	AQSLTEQMNKIALES—GG— Q ----HEEQ----MESD-NCSG
<i>Cricetulus griseus</i> (<i>Chinese hamster</i>)	AQSLTEQMNKIALES—GG— Q ----HEEQ----MESD-NCSG
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEL----MESD-NCSG
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Heterocephalus glaber</i> (<i>Naked rat</i>)	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEL----MESD-NCSG
<i>Homo sapiens</i> (Human)	AQSLTEQMNKIALES—GG— Q ----HEEQ----MESD-NCSG
<i>Drosophila melanogaster</i>	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEL----MESD-NCSG
<i>Xenopus tropicalis</i> (<i>Silurana tropicalis</i>)	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEL----MESD-NCSG
<i>Myotis lucifugus</i> (<i>Little brown bat</i>)	QRS-CGVRXHVLMCS—HE— F ----IPGQ----MESD-NCSG
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (<i>Giant panda</i>)	AQSLTEQMNKIALES—VG— Q ----PEEQ----MESD-NCSG
<i>Loxodonta africana</i> (<i>African elephant</i>)	LQASLCQVLGHRQLKF-----IPGQ----MESD-NCSG
<i>Cavia porcellus</i> (<i>Guinea pig</i>)	TAQALAEQMKKIALES—PG— Q -----SE----MESDNNNGSG
<i>Equus caballus</i> (<i>Horse</i>)	TAOSLAEOMNKIALES—GG— Q ----PEEQ----MESD-NCSG

Figura 24. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especies para la mutación p.R321C.

Se estudiaron 50 individuos sanos y sin antecedentes de enfermedades óseas en busca de la mutación p.R321C no encontrándose en ningún caso.

En el estudio de la distribución de la proteína p62 mediante inmunofluorescencia; nuestros resultados mostraron que en las células *COSI 321C* (transfectadas con la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1.321C*) la proteína p62 formaba agregados citoplasmáticos mientras que en las células *COSI WT* (transfectadas con la construcción *pCEFL-Flag/cDNA SQSTM1*) los agregados no se formaban (figura 25).

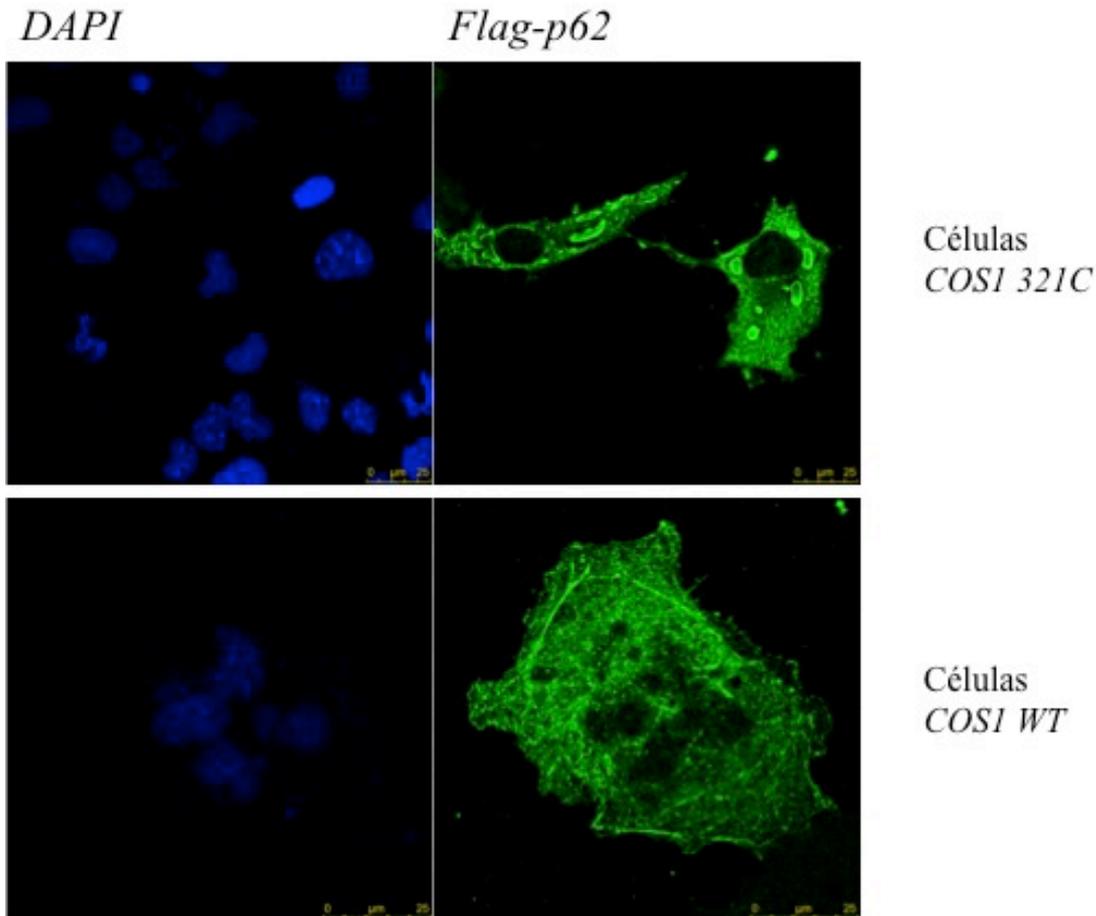


Figura 25. Ensayo de inmunofluorescencia en células *COSI WT* y en células *COSI 321C*.

Mediante un ensayo de co-inmunofluorescencia se analizó la distribución de las proteínas p62 y LC3; nuestros resultados mostraron que ambas proteínas co-localizan creando agregados citoplasmáticos en las células *COSI 321C*. En las células *COSI WT* no aparecen ni los agregados proteicos ni la co-localización entre las proteínas p62 y LC3 (figura 26-A). También mediante co-inmunofluorescencia, se analizó la distribución de las proteínas p62 y LAMP1. En las células *COSI 321C*, la proteína LAMP1 no forma parte de los agregados citoplasmáticos y no co-localiza con la proteína p62. En las células *COSI WT* no aparecen los agregados citoplasmáticos y LAMP1 no co-localiza con p62 (figura 26-B).

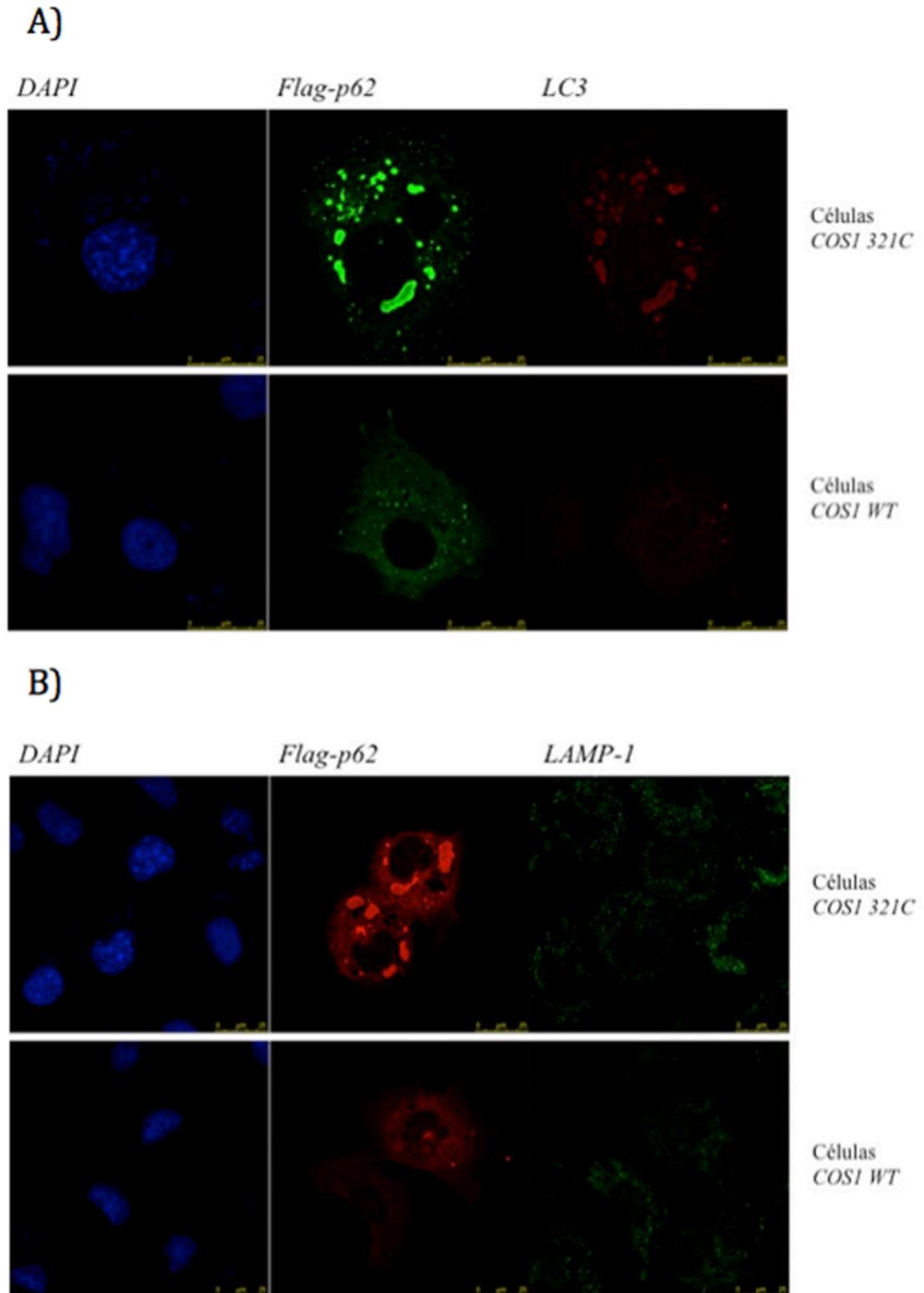


Figura 26. Ensayo de co-inmunofluorescencia de las proteínas p62 y LC3 en células *COSI 321C* y en células *COSI WT* (A). Ensayo de co-inmunofluorescencia de las proteínas p62 y Lamp1 en células *COSI 321C* y en células *COSI WT* (B)

Mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación se comprobó que en las células *COSI 321C* no se producía la interacción entre las proteínas p62 y LC3 mientras que en las células *COSI WT* la interacción entre ambas proteínas se producía correctamente (figura 27).

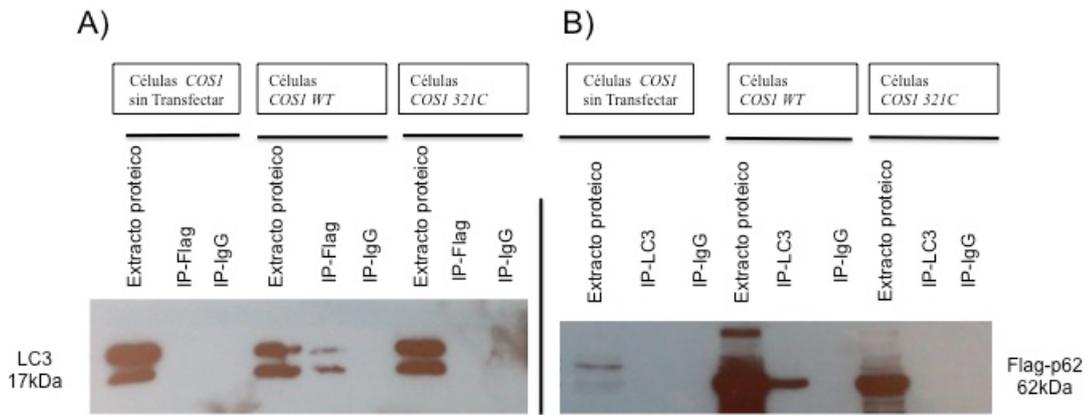


Figura 27. Ensayo de co-inmunoprecipitación en células *COSI 321C*, en células *COSI WT* y en células *COSI* sin transfectar. A) Inmunoprecipitación con un anticuerpo primario anti Flag-p62 y detección mediante Western Blot con un anticuerpo primario anti LC3. B) Inmunoprecipitación con un anticuerpo primario anti LC3 y detección mediante Western Blot con un anticuerpo primario anti Flag-p62.

Se llevó a cabo un Western Blot para analizar los niveles de la proteína p62 en las células *COSI WT* y células *COSI 321C* observándose cómo en las células *COSI R321C* hay unos mayores niveles de la proteína p62 que en las células *COSI WT*. (figura 28).

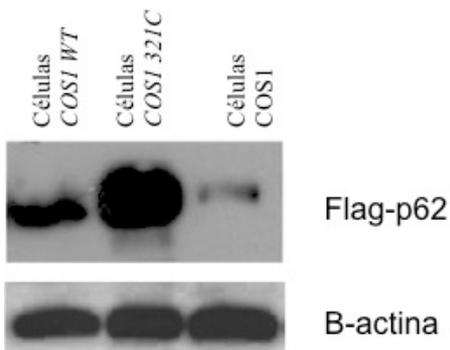
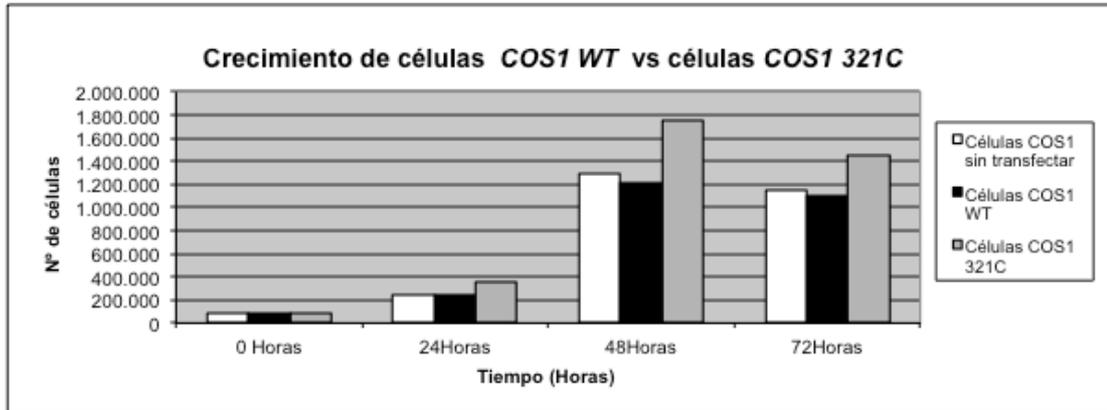


Figura 28. Expresión de la proteína p62 en células *COSI WT*, en células *COSI 321C* y en células *COSI* sin transfectar.

Se estudió también el crecimiento de las células *COSI WT* y de las células *COSI 321C* durante 3 días. Se llevó a cabo un conteo celular a las 24 , 48 y 72 horas de crecimiento. Nuestros resultados mostraron que había diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento: las células *COSI R321C* crecían más rápido que las células *COSI WT* a las 24 y 48 horas pero a las 72 horas de crecimiento no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (figura 29).



24 HORAS (p-valor)		
	Células <i>COS1 WT</i>	Células <i>COS1 321C</i>
Células sin transfectar	1,000	0,011
Células <i>COS1 WT</i>		0,013
48 HORAS (p-valor)		
	Células <i>COS1 WT</i>	Células <i>COS1 321C</i>
Células sin transfectar	1,000	0,021
Células <i>COS1 WT</i>		0,014
72 HORAS (p-valor)		
	Células <i>COS1 WT</i>	Células <i>COS1 321C</i>
Células sin transfectar	1,000	0,080
Células <i>COS1 WT</i>		0,053

Figura 29. Comparación de la proliferación celular entre células COS1 sin transfectar, células *COS1 WT* y células *COS1 321C*

5- ESTUDIO DE UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Con el objetivo de poner de manifiesto el significado biológico de la mutación p.R321C y su probable implicación en la etiopatogenia de la EOP se generó un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa la variante de la proteína p62 321C.

Los resultados preliminares del estudio del ratón transgénico, producto de la observación tanto del fenotipo como del comportamiento de los animales, son la alteración en el comportamiento de un ratón de 11 meses de edad, que consisten en hiperactividad, alteración del pelaje, agresividad y la aparición de crisis convulsivas generalizadas de tipo tónico-clónicas de escasos segundos de duración y con período postcrítico, se desencadenan de forma espontánea o causadas por situaciones de estrés. (video 1) (*El video 1 se adjunta en el formato digital de la Tesis Doctoral*)

Video 1. Comportamiento del ratón transgénico que sobre-expresa la variante de la proteína p62 p.321C

DISCUSIÓN



1- ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

La EOP es la enfermedad metabólica ósea más frecuente tras la osteoporosis³. Existe una gran controversia a la hora de afirmar si los pacientes con EOP sufren un mayor o menor envejecimiento que el resto de la población^{144,145}. En esta línea, resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron cómo los pacientes con Enfermedad Ósea de Paget de Salamanca tienen un menor riesgo cardiovascular comparado con la población general, describiéndose una menor prevalencia de enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión y dislipemia¹⁴⁶. Mediante el estudio de la longitud telomérica y de los polimorfismos TERC rs2293607 y TERC rs2735940 pretendemos aportar nuevos datos para poder definir, de un modo más exacto, el envejecimiento que sufren los pacientes con EOP.

En cada ciclo de división, la célula no es capaz de completar la replicación de los telómeros, por lo tanto, se van acortando progresivamente. La longitud telomérica a nivel leucocitario sirve como medida equiparable a la longitud telomérica del resto de tejidos de un organismo, actuando como un biomarcador del envejecimiento^{121,127,147}.

En nuestro trabajo, hemos encontrado que los pacientes con EOP presentan una menor longitud telomérica que los individuos sanos, lo que sugiere un posible envejecimiento prematuro en pacientes jóvenes con EOP (40-60 años) en relación con la población general. No obstante, al comparar el tamaño de los telómeros en sujetos entre 70 y 80 años no hemos encontrado diferencias significativas. Que sólo se encuentren diferencias significativas en la comparación entre pacientes y controles con un rango de edad de 40-60 años podría ser debido a que con el paso del tiempo las diferencias en la longitud telomérica se van mitigando debido a que el envejecimiento sufrido tanto por los pacientes como por los controles es parejo, o a que el tamaño de los telómeros está influenciado por otros factores como la dieta y probablemente los pacientes mayores de 70 años incluidos en nuestro trabajo han estado sometidos a una dieta diferente a la de los jóvenes¹⁴⁸. No obstante, la observación previa de que en nuestra cohorte de pacientes con EOP se observa una menor prevalencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial y dislipemia¹⁴⁶ nos permite especular con que el grupo de controles mayores de 70 años puede haber sufrido un mayor acortamiento telomérico que los pacientes, debido a la presencia de estas enfermedades que se asocian con un mayor acortamiento telomérico¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

La telomerasa es un complejo enzimático formado por tres subunidades: TERT con actividad transcriptasa inversa, TERC (un ácido ribonucleico) y DKC1 que actúa como una proteína auxiliar. Su función principal es llevar a cabo el alargamiento de los telómeros en las células germinales y en los tejidos en desarrollo¹³³. Los polimorfismos TERC rs2293607 (A>G) y TERC rs2735940 (T>C) se han asociado con variaciones en la actividad de la telomerasa: los alelos G y C de los polimorfismos TERC rs2293607 y

TERT rs2735940 se han relacionado con una disminución de la actividad de la telomerasa debido a que se produce una disminución de la actividad del promotor de la enzima^{152,153}. En nuestro estudio no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de los polimorfismos TERC rs2293607 y TERT rs2735940 entre pacientes con EOP y controles. Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en el estudio de la distribución genotípica de los polimorfismos TERC rs2293607 y TERT rs2735940 respecto a la longitud telomérica de los pacientes. Es sabido que no sólo los polimorfismos de la telomerasa influyen en su actividad, sino que otros complejos proteicos, como las *shelterinas* y en especial la subunidad TFR1^{134,154-156}, actúan modificando e inhibiendo la función de dicha enzima y, por lo tanto, la longitud del telómero por lo que podrán ser objeto de futuros estudios. Se ha demostrado que la desmetilación y la acetilación de las hebras localizadas en las zonas adyacentes a los telómeros constituyen un importante represor de la recombinación del DNA telomérico, por lo que también sería interesante analizar cambios epigenéticos a este nivel^{134,157,158}.

2- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

2.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA DETOXIFICACIÓN CELULAR: GSTM1, GSTP1 Y GSTT1.

Hay varias evidencias que nos indican que la EOP puede ser consecuencia de la interacción entre una serie de factores ambientales y determinados condicionantes genéticos. En este sentido, el contacto con toxinas ambientales durante la infancia ha sido descrito como uno de los factores que mayor influencia pudiera tener¹⁵⁹. Mediante el estudio de la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 (implicados en el metabolismo de toxinas exógenas) hemos pretendido evaluar la relación de estas variables génicas con el riesgo a desarrollar EOP.

El gen GSTM se localiza en el cromosoma 1p13 y, hasta el momento, se conocen cinco variables alélicas: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 y GSTM5. Está descrito que se produce una disminución de la actividad detoxificadora cuando se hereda deleciónado el gen GSTM1; es decir, ser portador en homocigosis de una deleción en el gen GSTM1 causa una disminución de la actividad enzimática. La clase *theta* de las GST comprende dos genes: GSTT1 y GSTT2. De igual modo que con el gen GSTM1, si se hereda en homocigosis la deleción del gen GSTT1 se produce una disminución de la actividad detoxificadora. La subfamilia GSTP comprende un único gen: GSTP1. En el gen GSTP1 se han descrito dos variantes alélicas que difieren en la base 313 del cDNA, una adenina (A) por una guanina (G); este cambio se traduce en el cambio de una valina (Val) por una isoleucina (Ile) en el codón 105 de la secuencia aminoacídica

de la proteína. Este cambio provoca una unión defectuosa de la enzima al sustrato y con ello una disminución de la actividad detoxificadora^{65-67,160}.

Ser portador en homocigosis de la delección en el gen GSTM1 y/o GSTT1 se ha asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de cáncer^{67,160,161}, enfermedad hepática por alcoholismo¹⁶² y otras enfermedades de carácter inflamatorio^{162,163} debido a que se produce una peor metabolización de los agentes tóxicos, lo cual supone la liberación de radicales libres que dañan el DNA. Nuestros resultados muestran que ser portador del gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP. Una de las causas que se postulan como origen de la EOP es la exposición a toxinas ambientales procedentes de la industria del algodón, carnes o agua sin los adecuados controles sanitarios; estas toxinas podrían alterar la maduración y actividad de los osteoclastos y así favorecer el desarrollo de la EOP por un aumento de la actividad osteoclástica^{15,52,56}. Ser portador de la delección del gen GSTM1 en homocigosis, supondría una metabolización deficiente de las toxinas ambientales que, por un mecanismo aún desconocido, podrían causar un aumento de la función de los osteoclastos y precursores osteoclásticos; lo cual, junto con otras alteraciones genéticas, desembocaría en el desarrollo de la EOP.

2.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DEL OSTEOCLASTO: VAV3

La EOP se produce como consecuencia de un aumento de la resorción ósea seguida de un aumento de la formación de hueso de forma compensatoria. El aumento de la resorción ósea se produce debido a que se produce un aumento del tamaño, número y actividad de los osteoclastos¹⁰⁵. *Faccio et al*, observaron en el año 2005 que en ratones *Vav3*^{-/-} se producía un aumento de la densidad ósea y un desorden de la estructura trabecular característica del hueso⁴⁷, histología que coincide con la descrita en el hueso pagético¹⁰⁵. El aumento de la densidad ósea que se observa en los ratones *Vav3*^{-/-} es debido a que se produce una disminución de la resorción ósea junto con un predominio de la formación de hueso. La disminución en la resorción ósea se produce por una maduración defectuosa de los osteoclastos debido a que *Vav3* es crucial en la maduración y activación de los osteoclastos⁴⁷. Las proteínas *Vav3* constituyen una de las familias Rho-GTPasas mejor caracterizadas. Las Rho GTPasas actúan como “interruptores moleculares”, ciclando entre un estado activo (unidas a GTP) y un estado inactivo (unidas a GDP)⁴⁴⁻⁴⁶. Por lo tanto, variaciones en el gen *VAV3* podrían tener un papel en el desarrollo de la EOP. El polimorfismo *VAV3* rs7528153 produce un cambio “*missense*” que supone el cambio T298S en la secuencia aminoacídica de la proteína *Vav*; este polimorfismo se localiza en el dominio SH de la proteína. Nuestros resultados muestran que ser portador bien del alelo T o del genotipo TT del polimorfismo *VAV3* rs7528153 suponen un incremento del riesgo a desarrollar EOP.

En el hueso pagético se produce la pérdida del equilibrio entre resorción y absorción ósea ¹⁰⁵, nuestros resultados sugieren que ser portador de una serina en vez de una treonina en la posición 298 del gen VAV3 (rs7528153) aumentaría la capacidad resortiva de los osteoclastos favoreciendo el desarrollo de la EOP. La proteína Vav3 es esencial en la polarización del osteoclasto, necesaria para que se inicie su actividad resortiva. Vav3 cicla entre su estado activo (unido a GTP) y su estado inactivo (unido a GDP); cuando Vav3 se activa se promueve el remodelado del citoesqueleto, de modo que se activa la secreción de vesículas y, por lo tanto, la capacidad de resorción del osteoclasto ⁴⁷. El intercambio entre GTP y GDP que sucede en la proteína Vav3 ocurre en su dominio SH, dominio en el que se localiza el polimorfismo VAV3 rs7528153. Por lo tanto, la presencia de una serina en la posición 298 de la proteína Vav3 podría favorecer que la unión Vav3-GTP sea más estable, suponiendo una prolongación de la fase activa del osteoclasto y por lo tanto un aumento de la resorción ósea.

2.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN AUTOFAGIA: ATG2B, ATG5, ATG10 Y ATG16L1

Aunque la etiología de la EOP aún no está clara, se ha sugerido que alteraciones en la autofagia pueden desempeñar un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad ¹⁰⁵. Mediante el estudio de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 pretendimos analizar el posible papel de estas variantes alélicas en el desarrollo de la EOP. Tres de los cuatro polimorfismos estudiados son cambios “*missense*” que suponen alteraciones en la secuencia de aminoácidos de las respectivas proteínas (ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183 y ATG16L1 rs2241880), mientras que el polimorfismo ATG5 rs2245214 es intrónico.

El gen ATG16L1 es un adaptador crucial en la formación del autofagosoma ¹⁶⁴. El polimorfismo ATG16L1 rs2241880 (p.300 Thr>Ala) se ha asociado, entre otros, con un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad de Crohn ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Los aminoácidos 296-299 de la proteína Atg16L1 forman un dominio de unión a la caspasa 3, de manera que la variante p.300Ala de la proteína Atg16L1 es más sensible a la acción de la caspasa 3 y se degrada antes que la variante p.300Thr de la proteína Atg16L1, por lo que la proteína p.300Ala se asocia con una disminución de la autofagia ¹⁶⁷. Nuestros resultados muestran que ser portador del genotipo CC (p.300 Ala/Ala) aumenta el riesgo de desarrollar EOP posiblemente por una disminución del proceso autofágico ¹⁰⁵.

El complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 determina el sitio de formación de los autofagosomas debido a que controla la unión con la proteína LC3. Durante el proceso de autofagia el complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 se degrada en el interior de los autofagolisosomas, disminuyendo los niveles de la proteína Atg5 ^{107,168}. Se ha demostrado que en ratones transgénicos que desarrollan EOP los niveles de la proteína Atg5 están elevados, lo cual nos indica que durante el transcurso de la EOP se produce una disminución de la autofagia ¹¹⁷. El polimorfismo ATG5 rs2245214 ya ha sido

estudiado en pacientes con tuberculosis¹⁶⁹ y lupus eritematoso¹⁷⁰. En nuestro estudio, ser portador del alelo G supone un aumento del riesgo a desarrollar EOP. Dado que el polimorfismo ATG5 rs2245214 está localizado en un intrón, especulamos con que podría causar indirectamente un descenso de la autofagia al modificar la estabilidad del RNA o podría estar ligado a otro polimorfismo exónico no incluido en nuestro estudio que se asocie a una disminución de la función de ATG5 y al desarrollo de EOP.

En la formación del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 es fundamental la participación de Atg10, una ligasa de tipo E2^{82,107-109}. En nuestro estudio, ser portador del alelo T del polimorfismo ATG10 rs1864183 se relaciona con una disminución del riesgo a desarrollar EOP, siendo esta asociación mayor en el caso de ser portador del genotipo homocigoto TT. El polimorfismo ATG10 rs1864183 supone el cambio T212M. La variante p.212Met de la proteína Atg10 podría asociarse con un aumento de la autofagia y, por ello, con una disminución del riesgo a desarrollar EOP. En estudios recientes se ha observado cómo el genotipo TT del polimorfismo ATG10 rs1864183 se asocia con modificaciones en la síntesis de IL-8¹⁶⁹. Las citoquinas son fundamentales en la señalización entre las células óseas, siendo IL-8 clave en la regulación de la osteoclastogénesis y la resorción ósea^{171,172}. En un trabajo previo de nuestro grupo llevado a cabo con 172 pacientes con EOP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo -251IL-8 entre pacientes y controles¹⁷³. Sería interesante analizar los niveles séricos de IL-8 en pacientes con EOP e intentar relacionarlos con el polimorfismo ATG10 rs1864183.

El gen ATG2B es fundamental en la formación del autofagosoma y en la regulación del tamaño y distribución de los agregados lipídicos¹⁷⁴. Este es el primer trabajo en el que se analiza el polimorfismo ATG2B rs3759601. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en la distribución de los genotipos del polimorfismo ATG2B rs3759601 entre pacientes con EOP y controles.

No hemos encontrado diferencias significativas en el análisis de la distribución de los polimorfismos ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 en función de las diferentes variables clínicas de los pacientes. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la autofagia pueden ser importantes en la patogenia de la EOP pero probablemente no condicionan las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En resumen, en los osteoclastos del hueso pagético se han observado inclusiones citoplasmáticas que se asocian con una disminución de la autofagia. Estas inclusiones podrían corresponder con agregados proteicos que no es posible eliminar debido a una disminución de la autofagia. Nuestros resultados muestran que ser portador del alelo C del polimorfismo ATG16L1 rs2241880 y del alelo G del polimorfismo ATG5 rs2245214 se asocia con una disminución de la autofagia y, por lo tanto, con un incremento del riesgo de desarrollar EOP; mientras que ser portador del alelo T del

polimorfismo ATG10 rs1864183 se asocia con una disminución del riesgo a desarrollar EOP debido a que se produciría un aumento de la autofagia, reforzando el interés del estudio de esta vía en los pacientes con EOP tanto para el diagnóstico de la enfermedad como el posible desarrollo de nuevos fármacos.

3- ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET. ASOCIACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO.

En el momento actual se ha demostrado una asociación directa entre la presencia de mutaciones en el gen SQSTM1, que codifica la proteína p62, que desempeña un papel importante en la encrucijada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis y el desarrollo de EOP¹⁰⁵.

En nuestra serie de 310 pacientes con diagnóstico probado de EOP, 53 pacientes (17,15%) tenían antecedentes familiares y 257 pacientes (82,9%) eran de carácter esporádico. Los 53 pacientes familiares formaban parte de 32 familias diferentes. En la EOP se ha descrito una fuerte tendencia a la agregación familiar (entre un 15-40% de los pacientes son de carácter familiar) con un riesgo relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre los familiares de los pacientes^{62,175}, por lo tanto, la proporción entre pacientes familiares-esporádicos de nuestra serie se corresponde con lo ya descrito en otras series.

Nuestros resultados mostraron que 18 pacientes con antecedentes familiares (34,0%) y 12 pacientes esporádicos (4,7%) eran portadores de mutación en el gen SQSTM1. Se ha descrito que entre el 20-40% de los pacientes con antecedentes familiares y entre el 5-10% de los pacientes de carácter esporádico son portadores de mutación en el gen SQSTM1^{61,62,175}. El porcentaje de pacientes con antecedentes familiares portadores de mutación en el gen SQSTM1 de nuestra cohorte coincide con lo descrito en la bibliografía. Sin embargo, el porcentaje de pacientes esporádicos portadores de mutación en el gen SQSTM1 es menor a lo ya descrito (4,7% frente al 5-10%), esto podría ser debido a que todos los pacientes incluidos en nuestro estudio proceden de la provincia de Salamanca y está descrito que tanto la prevalencia como la incidencia de mutaciones en el gen SQSTM1 depende de la zona geográfica de donde provengan los pacientes⁷⁷.

Los 18 pacientes con antecedentes familiares (34,0%) que eran portadores de mutación en el gen SQSTM1 forman parte de 14 familias diferentes. En estas 14 familias había 17 sujetos que eran portadores de mutación en el gen SQSTM1 pero no desarrollaron EOP. La media de edad de estos sujetos fue de 42,6 años, con un rango de 16 a 56 años. Que estos 17 sujetos sean portadores de mutación en el gen SQSTM1 y no desarrollen EOP puede ser debido a que sean demasiado jóvenes para desarrollar la enfermedad, ya que la EOP se suele diagnosticar por encima de los 55 años, y es una enfermedad rara por debajo de los 40^{3,6,176}. La media de edad de diagnóstico de los

pacientes de nuestra cohorte portadores de mutación en el gen SQSTM1 es de 60,72 años (DS=12,22), por lo tanto, es probable que estos 17 familiares sin EOP y portadores de mutación puedan desarrollar manifestaciones clínicas de la enfermedad en el futuro. Otra posible hipótesis para explicar la existencia de familiares portadores de mutación en el gen SQSTM1 sin manifestaciones clínicas sería la exposición diferencial a factores ambientales entre individuos de la misma familia, ya que el modelo más aceptado para explicar la etiopatogenia de la EOP es un modelo que integra la participación de factores ambientales y genéticos^{49,64}.

En nuestro estudio hemos encontrado tres pacientes que no eran portadores de mutación en el gen SQSTM1 y pertenecen a dos familias en las que al menos hay un paciente portador de mutación, es decir existe una penetrancia variable de las mutaciones del gen SQSTM1 dentro de la misma familia. Este fenómeno ya ha sido descrito por otros grupos^{61,177}. Que en la misma familia encontremos pacientes portadores de mutación en el gen SQSTM1 y pacientes no portadores de mutación podría ser debido a un fenómeno de heterogeneidad de locus, es decir, mutaciones en otros genes también jugarían un importante papel en el desarrollo de la enfermedad. La presencia de pacientes sin mutación en el gen SQSTM1 pertenecientes a familias con al menos otro paciente portador de mutación apoya la hipótesis de la interacción entre factores ambientales y genéticos^{49,64}.

En 18 familias con EOP incluidas en nuestro trabajo no hemos encontrado ningún paciente portador de mutación en el gen SQSTM1 (56,25% de las familias), lo cual sugiere que puedan estar mutados genes diferentes al gen SQSTM1 y/o la participación de factores ambientales esenciales en la patogenia de la EOP.

En este trabajo hemos encontrado 14 familias en las que al menos hay un paciente portador de mutación en el gen SQSTM1 (43,75%). La incidencia de mutaciones en el gen del SQSTM1 en familias con EOP oscila entre el 40-50%, por lo que nuestros resultados son comparables a lo descrito en otros estudios^{62,105}.

En tres de estas familias hay más de un paciente portador de mutación en el gen SQSTM1. En dos de ellas todos los pacientes son portadores de mutación en el gen SQSTM1, mientras que la tercera familia tiene dos pacientes con mutación y otros dos pacientes que no son portadores de mutación en el gen SQSTM1. La penetrancia de las mutaciones en el gen SQSTM1 varía en función de la familia; dato que apoya que la enfermedad no está causada por mutaciones en un sólo gen, sino que hay que pensar en un fenómeno de heterogeneidad de locus para explicar el origen de la EOP.

En once familias sólo hay un paciente portador de mutación. En siete de estas once familias hay al menos un paciente al que no se le ha podido llevar a cabo el estudio molecular del gen SQSTM1, por lo tanto no somos capaces de definir la penetrancia que tiene la mutación en estas familias. En cuatro de las once familias el “*propositus*” es el

portador de la mutación en el gen SQSTM1 pero tienen descendientes que son portadores de mutación pero aún no han desarrollado manifestaciones clínicas de la enfermedad, la edad media de estos sujetos es de 43,16 años con un rango de 29 a 55 años, por lo tanto, es probable que desarrollen la enfermedad en el futuro pues aún son demasiado jóvenes^{3,6,176}.

18 pacientes con antecedentes familiares eran portadores de mutación en el SQSTM1: 12 pacientes (66,7%) son portadores de la mutación p.P392L, 3 pacientes (16,7%) de la mutación p.E274D, un paciente (5,6%) de la mutación p.M404T, un paciente (5,6%) de la mutación p.R321C y un paciente (5,6%) de la mutación p.A426V. Nuestros resultados mostraron que 12 pacientes esporádicos (4,7%) eran portadores de mutación en el gen SQSTM1: 8 pacientes (66,7%) eran portadores de la mutación p.P392L, 2 pacientes de la mutación p.R321C (16,7%) y dos pacientes son portadores de la mutación p.E273D. Todos los pacientes eran portadores de mutación en heterocigosis; en nuestra cohorte no hay ningún paciente portador de mutación en homocigosis aunque si se ha descrito en otros estudios⁶¹.

Hasta la fecha se han descrito 28 mutaciones puntuales en el gen SQSTM1 en pacientes con EOP⁷⁷. Todas ellas, salvo cuatro mutaciones, están localizadas en el dominio UBA de la proteína p62^{77,119,178-180}. En nuestra muestra de pacientes la mutación más recurrente es la mutación p.P392L, lo cual concuerda con lo descrito en otras cohortes de pacientes⁷⁷.

En nuestro trabajo hemos descrito las mutaciones p.E274D, p.R321C, p.M404T, p.P392L y p.A426V. Las mutaciones p.M404T, p.P392L y p.A426V están localizadas en el dominio UBA de la proteína p62, la mutación p.E274D lo está en el primer dominio PEST y la mutación p.R321C está localizada en el dominio LIR. Este es el primer trabajo en el cual se encuentran las mutaciones p.E274D y p.R321C en pacientes con EOP⁷⁷.

La mutación p.P392L está localizada en el dominio UBA de la proteína p62 y tiene como consecuencia la pérdida de la capacidad de unión a proteínas ubiquitinadas y a un aumento de la actividad NF-κB. La generación de ratones modificados genéticamente portadores de la mutación ha puesto de manifiesto un incremento en el número de osteoclastos, aunque están ausentes otras características de los osteoclastos pagéticos como la hipersensibilidad a 1,25(OH)₂D₃¹⁸¹.

En el codón 404 se han descrito dos mutaciones hasta el momento, M404V y M404T que se diferencian porque en el primer caso la mutación se localiza en el nucleótido +1250 y, en el segundo caso se localiza en el nucleótido +1251 del cDNA del gen SQSTM1¹⁸². Mientras que la mutación p.M404V se ha descrito en italianos y españoles^{183,184}, la mutación p.M404T se ha descrito hasta el momento sólo en sujetos asiáticos¹⁸⁵; nuestro trabajo es el primero en el que se objetiva la mutación p.M404T

en población caucásica. La mutación p.M404T se localiza en la región hidrofóbica del dominio UBA, en el lazo que hay entre las hélices 1 y 2¹⁸⁵, pudiendo alterar la capacidad de interacción de la proteína p62 con proteínas ubiquitinadas.

La proliferación y activación de los osteoclastos se produce gracias a la activación de la ruta NF-κB; proceso en el que la proteína p62 juega un importante papel ⁷⁰. Cuando los osteoclastos alcanzan su maduración es necesaria una señal negativa que frene tanto su proliferación como activación, una señal que cause el bloqueo de la activación de la ruta NF-κB. En este proceso de inhibición de la ruta NF-κB desempeña un papel crucial la desubiquitinasa CYLD, la cual requiere ser activada para desempeñar su función: desubiquitinar a la proteína TRAF6 y así bloquear la activación de la ruta NF-κB. El dominio UBA de la proteína p62 es capaz de ubiquitinar y activar a la proteína CYLD ¹⁰¹. Las mutaciones p.P293L y p.M404T se localizan en el dominio UBA de la proteína p62. La presencia de estas mutaciones supondría la pérdida de la capacidad de ubiquitinización de la proteína p62 evitando la activación de la proteína CYLD, dando lugar a una activación descontrolada de la ruta NF-κB que causa la activación y proliferación desmesurada de los osteoclastos facilitando el desarrollo de la EOP.

Poca es la información acerca de la mutación p.A426V ⁷⁷. Hasta el momento se han descrito tres mutaciones contiguas a la descrita en la posición 426 asociadas a la EOP : p.G425E, p.G425R y A427D ^{77,185}. Todas estas mutaciones se localizan en la región hidrofóbica de la hélice 3 del dominio UBA de la proteína p62. Debido a la falta de información sobre la mutación p.A426V y su aparición en nuestra cohorte de pacientes decidimos realizar estudios “*in silico*” y un estudio poblacional para intentar caracterizar las consecuencias de dicha variable.

Nuestros resultados muestran que ser portador de mutación en el gen SQSTM1 se asocia con pacientes con antecedentes familiares. También, que ser portador de mutación se relaciona con una menor edad de diagnóstico y un mayor número de huesos afectados. En definitiva, en nuestro estudio confirmamos que los pacientes portadores de mutación en el gen SQSTM1 tienen una enfermedad más agresiva que los pacientes que no son portadores de mutación en este gen, como ya habían descrito otros grupos ^{180,186}.

4- CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN SQSTM1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

Cinco pacientes con EOP eran portadores de la mutación p.E274D, tres pacientes eran portadores de la mutación p.R321C y un paciente lo era de la mutación p.A426V. Las mutaciones p.E274D y p.R321C están localizadas en el exón 6 del gen SQSTM1 mientras que la mutación p.A426V lo está en el exón 8.

La mutación p.A426V ya ha sido descrita en pacientes con EOP, pero debido a la falta de estudios sobre su posible patogenicidad decidimos analizarla en más profundidad. Las mutaciones p.E273D y p.R321C es la primera vez que se describen en pacientes con EOP.

4.1 MUTACIÓN p.E274D

Este es el primer trabajo que describe la mutación p.E274D en pacientes con EOP, previamente ha sido descrita en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica y en pacientes con Demencia Frontotemporal¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. La mutación p.E274D se encontró en cinco pacientes con EOP; tres pacientes tenían antecedentes familiares mientras que dos eran de carácter esporádico.

El resultado del estudio “*in silico*” nos mostró que los tres programas bioinformáticos usados (Sift, pMUT y Polyphen) categorizan a la variante p.E274D como una mutación *neutral*. El estudio de conservación aminoacídica inter-especies nos mostró que el aminoácido E está poco conservado y que en el elefante africano (*Loxodonta africana*) existe una D en esta posición; sin embargo, la homología proteica de esta especie difiere con el resto de especies. La variante p.E274D no se encontró en ninguno de los 50 controles analizados, pero los resultados de nuestro estudio poblacional son contradictorios al llevado a cabo por *Van der Zee et al* ; en el cual encuentran en un estudio de 3899 controles un total de 79 controles portadores de la variante p.E274D; es decir, localizan la mutación en el 2,02%¹⁸⁹, por lo que habría que considerar a la mutación p.E274D como un polimorfismo pues aparece en más del 1% de la población sana.

La variante p.E274D se origina como consecuencia de la mutación c.1000G>C. Se localiza en la parte del exón 6 del gen SQSTM1 que codifica al primer dominio PEST de la proteína p62. Los dominios PEST son dominios ricos en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), que actúan como péptido señal que dirige la degradación de proteínas de una vida media corta¹⁰⁰.

La EOP se produce como consecuencia de un aumento de la osteoclastogénesis debido a que se produce una desregulación de la ruta NF-kB¹⁰⁵. La proteína p62 juega un papel dual en la ruta NF-kB : a través de su dominio PDB, promueve la activación de la ruta NF-kB y a través de sus dominios PEST y UBA promueve el freno de la activación de la ruta NF-kB⁶⁹. Nuestra hipótesis es que la mutación p.E274D podría afectar a la conformación del dominio PEST y con ello inducir una desregulación de la ruta NF-kB que se traduciría en un aumento de la osteoclastogénesis y el desarrollo de la enfermedad. Para confirmar nuestra hipótesis llevamos a cabo un ensayo de inmunofluorescencia para estudiar la localización de la proteína p62 y un ensayo de Western Blot para analizar la expresión de las proteínas NF-kB y p62 a lo largo del tiempo. Los estudios funcionales nos mostraron que en las células *COS1 274D* no se

alteraba la localización de la proteína p62 ni la expresión de las proteínas NF-kB ni p62 a lo largo del tiempo.

La conjunción de los resultados funcionales, los estudios “*in-silico*” y el resultado del estudio poblacional llevado a cabo por *Van der Zee et al*¹⁸⁹ nos llevan a concluir que la variante p.E274D es muy probablemente un polimorfismo poblacional que aumenta la predisposición a padecer EOP.

4.2 MUTACIÓN p.A426V

En nuestro estudio encontramos un paciente con antecedentes familiares portador de la mutación p.A426V. La variante p.A426V se localiza en el exón 8 del gen SQSTM1, que codifica al dominio UBA de la proteína p62.

La variante p.A426V ya ha sido descrita en pacientes con EOP⁷⁷, pero debido a la falta de estudios que analicen su posible patogeneicidad decidimos estudiarla con más profundidad.

Los programas bioinformáticos Polyphen y pMUT caracterizaron a la mutación como *patogénica*, mientras que el programa Sift la clasificó como una mutación *neutral*. El estudio de conservación aminoacídica inter-especies nos mostró que el aminoácido A está muy conservado. En el estudio poblacional que llevamos a cabo en 50 individuos sanos encontramos la mutación p.A426V en cuatro controles. Los resultados de nuestro estudio poblacional nos sugieren que la variante p.A426V es un polimorfismo, pues aparece en más del 1% de los controles estudiados. Los resultados de nuestro estudio se corroboran con los mostrados en un estudio molecular del gen SQSTM1 en casi 4000 controles en el que encuentran esta mutación en el 5,6% de los controles, porcentaje suficiente como para considerarlo un polimorfismo poblacional¹⁸⁹.

A la vista de los resultados obtenidos consideramos a la variante p.A426V como un polimorfismo.

4.3 MUTACIÓN p.R321C

La mutación p.R321C se localizó en tres pacientes con EOP; dos tenían antecedentes familiares mientras que el tercer paciente era de carácter esporádico.

La mutación p.R321C no ha sido descrita hasta el momento en ningún paciente con EOP, aunque se ha descrito en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica y en pacientes con Demencia Frontotemporal¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Recientemente se ha asociado el gen SQSTM1 con una mayor susceptibilidad a desarrollar Esclerosis Lateral

Amiotrófica y Demencia Frontotemporal debido a que la proteína p62 desempeña un importante papel en la degradación de proteínas vía proteosoma y a través de la autofagia¹⁸⁹. La alteración de estos mecanismos se relaciona con procesos de neurodegeneración, habiéndose encontrado inclusiones de agregados proteicos de p62 en enfermedades como el Alzheimer, Pick, Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas^{115,192}.

El estudio “*in-silico*” nos mostró que los programas bioinformáticos Polyphen y pMUT categorizan a la mutación p.R321C como *patogénica*, mientras el programa Sift la considera *neutral*. El estudio de conservación del residuo R muestra poca conservación entre especies. La variante p.R321C se localizó en tres pacientes con EOP (de un total de 310 pacientes estudiados) y no se encontró en ninguno de los 50 individuos sanos estudiados. Estos resultados nos sugieren que la mutación p.R321C podría tener relevancia en el origen de la EOP y no tratarse de una variante polimórfica.

Esta mutación ha sido descrita en 2014 en tres pacientes con Demencia Frontotemporal (de un total de 1808 pacientes estudiados), en un paciente con Esclerosis Lateral Amiotrófica (de un total de 395 pacientes estudiados) y en un individuo sano (de un total de 3899 controles estudiados)¹⁸⁹.

La variante p.R321C se origina como consecuencia de la mutación g.1139C>T. Esta mutación se localiza en la parte del exón 6 del gen SQSTM1 que codifica al dominio LIR de la proteína p62; este dominio lleva a cabo un papel crucial en el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas mediante el proceso de autofagia al interaccionar con la proteína LC3 para anclar las proteínas que serán eliminadas a la membrana del autofagosoma⁸³⁻⁸⁵. Tanto en las enfermedades neurodegenerativas descritas anteriormente como en la EOP se ha descrito la aparición de inclusiones citoplasmáticas que podrían corresponder con agregados proteicos que se acumulan como resultado de un proceso deficiente de autofagia^{56,108,110,115,159}.

El ensayo de inmunofluorescencia nos mostró que en las células *COS1 321C* las proteínas p62 y LC3 co-localizan en unos agregados citoplasmáticos que nos recuerdan a los autofagosomas o autofagolisosomas que se forman en el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas. La proteína LAMP1 es una proteína transmembrana que en el momento de la fusión autofagosoma-lisosoma pasa a formar parte de la membrana del autofagolisosoma⁸². En los agregados citoplasmáticos observados en las células *COS1 321C* p62 no co-localiza con la proteína LAMP1, lo cual nos sugiere que los agregados proteicos corresponderían con autofagosomas antes de la fusión con los lisosomas.

Mediante el ensayo de inmunoprecipitación observamos que en las células *COS1 321C* no co-precipita con LC3, lo que podría producir un bloqueo de la autofagia. Las proteínas p62 y LC3 podrían co-localizar en el citoplasma pero sin llegar a interaccionar.

Durante el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas la proteína p62 se elimina con el resto de componentes englobados por el autofagosoma. Es decir, los niveles proteicos de p62 nos dan una idea del nivel autofágico de una célula: niveles altos de p62 se relacionan con un bloqueo de la autofagia mientras que niveles bajos de p62 se asocian con la activación de la autofagia⁸⁴. Nuestros resultados mostraron que en las células *COS1 321C* había mayores niveles de la proteína p62 que en las células *COS1 WT*; es decir, la actividad autofágica en las células *COS1 321C* es menor que en las células *COS1 WT*; resultado que apoya que la mutación p.R321C en la proteína p62 causa un bloqueo de la autofagia debido a la falta de interacción entre las proteínas p62 y LC3.

Nuestros resultados mostraron que las células *COS1 321C*, células en la que se produce un bloqueo de la autofagia, tenían una mayor tasa de división celular que las células *COS1 WT*. La proteína p62 desempeña un papel fundamental en gran variedad de funciones como supervivencia celular, apoptosis, autofagia y degradación proteica. La proteína p62 induce la proliferación celular a través de la activación de la ruta NF- κ B^{68,70,71}. El aumento de los niveles de la proteína p62, consecuencia del bloqueo de la autofagia en las células *COS1 321C*, podría dar lugar a un aumento de la activación de la ruta NF- κ B, traduciéndose en una mayor proliferación celular.

La EOP se produce como consecuencia de un aumento de la resorción ósea debido a que se produce un aumento en el número, tamaño y actividad de los osteoclastos. En los osteoclastos del hueso pagético se han localizado inclusiones citoplasmáticas que sugieren que alteraciones en la autofagia podrían jugar un importante papel en el desarrollo de la enfermedad¹⁰⁵. Nuestros resultados muestran que la mutación p.R321C (localizada en tres pacientes con EOP) causa un bloqueo de la autofagia que supone un aumento de los niveles de la proteína p62, y que a su vez, causa un aumento de la proliferación celular. Los agregados citoplasmáticos que se observan en los osteoclastos podrían ser debidos a una disminución de la autofagia como consecuencia de una mutación en p62 que impide su interacción con LC3; lo que podría inducir un aumento de la activación de la ruta NF- κ B que se traduciría en una mayor proliferación osteoclástica y en el consecuente desarrollo de la EOP.

En este contexto y con el fin de poner de manifiesto el significado biológico de la mutación p.321C y su probable implicación en la etiopatogenia de la EOP se generó un ratón transgénico que sobre-expresa la variante p.321C de la proteína p62. Como resultado del estudio de la primera generación de ratones transgénicos, se ha observado un ratón que presenta alteraciones en el comportamiento que consisten en hiperactividad, alteración del pelaje, agresividad y la aparición de crisis convulsivas generalizadas de tipo tónico-clónicas de escasos segundos de duración y con periodo postcrítico, se desencadena de forma espontánea o causadas por situaciones de estrés.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica es una enfermedad de la primera y de la segunda motoneurona del adulto, que se caracteriza por pérdida neuronal a nivel de la

corteza motora, el asta anterior de la médula y los núcleos motores del tronco cerebral, excepto los oculomotores. La edad media de inicio es de 61 años y se caracteriza por atrofia muscular, fasciculaciones y debilidad generalizada¹⁹³. La Degeneración Lobular Frontotemporal consiste en la atrofia progresiva de los lóbulos frontales y regiones anteriores de los lóbulos temporales. Ésta puede derivar en Demencia Frontotemporal, que se caracteriza por cambios en la conducta social y personal asociados a apatía, desinhibición y alteración progresiva del lenguaje. Aproximadamente, la mitad de los pacientes con Demencia Frontotemporal tienen antecedentes familiares. La edad media de diagnóstico es de entre 45-60 años aunque puede aparecer a cualquier edad de la vida adulta¹⁹⁴. Se ha descrito que los pacientes con Demencia Frontotemporal pueden cursar con crisis convulsivas^{195,196}. Por lo tanto, las crisis convulsivas descritas en nuestro ratón transgénico podrían tener su origen en una Degeneración Frontotemporal o en un síndrome neurodegenerativo cortical que se asocie con alteraciones en el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas, todo ello causado por el bloqueo de la autofagia debido a la mutación p.R321C de la proteína p62.

Por otro lado, en la EOP pueden producirse complicaciones en el sistema nervioso central secundarias a compresión directa de estructuras neurológicas por crecimiento óseo y/o por insuficiencia vascular secundaria a fenómenos de robo vascular por la hipervascularización del hueso^{23,24}. En este sentido y, como consecuencia de una posible hiperostosis, se podría producir una hiperestimulación cortical que desencadenase en las crisis convulsivas observadas en el animal estudiado. También como consecuencia del crecimiento y deformidad ósea se podría producir una alteración del sistema de drenaje del líquido cefalorraquídeo derivando en una hidrocefalia que secundariamente podría originar esas crisis convulsivas. El que puedan existir zonas de isquemia en ciertas áreas del cerebro del animal por fenómeno de robo vascular también podría contribuir a estos episodios convulsivos. Por último, se han descrito alteraciones en el comportamiento como el delirio, ansiedad, alucinaciones y psicosis en pacientes con EOP¹⁹⁷⁻²⁰⁰, este tipo de afecciones podrían justificar parte del comportamiento anómalo de nuestro ratón.

En el futuro a este ratón se le someterá a más pruebas diagnósticas para el esclarecimiento del origen de este fenotipo.

CONCLUSIONES



Primera. Los pacientes con Enfermedad Ósea de Paget entre 40-60 años presentan una longitud telomérica significativamente inferior a los controles lo que nos sugiere que el desarrollo de esta enfermedad podría asociarse con un envejecimiento celular prematuro.

Segunda. En nuestro trabajo se muestra que ser portador del gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar Enfermedad Ósea de Paget, lo que refuerza la hipótesis de que polimorfismos en algunos genes metabolizadores de toxinas ambientales podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Tercera. Nuestro trabajo refleja por primera vez, que el alelo T del polimorfismo rs7528153 del gen VAV3 está asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar Enfermedad Ósea de Paget apoyando la existencia de un componente poligénico en el desarrollo de la enfermedad.

Cuarta. Los resultados del estudio molecular del gen SQSTM1 en nuestra cohorte de pacientes con Enfermedad Ósea de Paget ponen de manifiesto que la proporción de casos sin mutación en este gen es muy elevada. La existencia de sujetos portadores de mutación sin enfermedad y de pacientes sin mutación dentro de una misma familia, muestra la penetrancia variable de las mutaciones del gen SQSTM1. Todo ello nos sugiere que otros genes podrían desempeñar un importante papel en el desarrollo de esta enfermedad.

Quinta: En este trabajo mostramos por primera vez la presencia de dos mutaciones en el exón 6 del gen SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget, por lo que proponemos que en los estudios de este gen se incluya el estudio de este exón.

Sexta. El estudio de los polimorfismos ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 y ATG5 rs2245214 y de la mutación p.R321C del gen SQSTM1 confirma que la alteración de la autofagia desempeña un importante papel en el desarrollo de la Enfermedad Ósea de Paget y podría ser una posible diana terapéutica

BIBLIOGRAFÍA



1. Roodman, G. D. Insights into the pathogenesis of Paget's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 176–180 (2010).
2. Ralston, S. H. & Layfield, R. Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* **91**, 97–113 (2012).
3. Corral-Gudino, L., Borao-Cengotita-Bengoa, M., Del Pino-Montes, J. & Ralston, S. Epidemiology of Paget's disease of bone: a systematic review and meta-analysis of secular changes. *Bone* **55**, 347–352 (2013).
4. Paget, J. On a Form of Chronic Inflammation of Bones (Osteitis Deformans). *Med Chir Trans* **60**, 37–64.9 (1877).
5. Paget, J. Additional Cases of Osteitis Deformans. *Med Chir Trans* **65**, 225–236 (1882).
6. Davie, M. *et al.* Paget's disease of bone: a review of 889 patients. *Bone* **24**, 11S–12S (1999).
7. Van Staa, T. P. *et al.* Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 465–471 (2002).
8. Reasbeck, J. C., Goulding, A., Campbell, D. R., Beale, L. R. & Stewart, R. D. Radiological prevalence of Paget's disease in Dunedin, New Zealand. *Br Med J (Clin Res Ed)* **286**, 1937 (1983).
9. Guyer, P. B. & Chamberlain, A. T. Paget's disease of bone in two American cities. *Br Med J* **280**, 985 (1980).
10. Dahniya, M. H. Paget's disease of bone in Africans. *Br J Radiol* **60**, 113–116 (1987).
11. Falch, J. A. Paget's disease in Norway. *Lancet* **2**, 1022 (1979).
12. Eekhoff, M. E. M. W. *et al.* Paget's disease of bone in The Netherlands: a population-based radiological and biochemical survey--the Rotterdam Study. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 566–570 (2004).
13. Detheridge, F. M., Guyer, P. B. & Barker, D. J. European distribution of Paget's disease of bone. *Br Med J (Clin Res Ed)* **285**, 1005–1008 (1982).
14. Del Pino-Montes, J. *et al.* [Characteristics of Paget's disease in Spain. Data from the National Paget's Register]. *Reumatol Clin* **5**, 109–114 (2009).
15. Mironón-Canelo, J. A., Pino-Montes, J. D., Vicente-Arroyo, M. & Sáenz-González, M. C. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). *Eur J Epidemiol* **13**, 801–805 (1997).
16. Barker, D. J., Chamberlain, A. T., Guyer, P. B. & Gardner, M. J. Paget's disease of bone: the Lancashire focus. *Br Med J* **280**, 1105–1107 (1980).

17. Morales Piga, A., López-Abente, G., García Vadillo, A., Ibáñez, A. E. & González-Lanza, M. [Features of Paget's disease of bone in a new high-prevalence focus]. *Med Clin (Barc)* **95**, 169–174 (1990).
18. Tiegs, R. D., Lohse, C. M., Wollan, P. C. & Melton, L. J. Long-term trends in the incidence of Paget's disease of bone. *Bone* **27**, 423–427 (2000).
19. Bolland, M. J. & Cundy, T. Paget's disease of bone: clinical review and update. *J Clin Pathol* **66**, 924–927 (2013).
20. Gumà, M. *et al.* [Paget's disease of bone: study of 314 patients]. *Med Clin (Barc)* **119**, 537–540 (2002).
21. Altman, R. D. Musculoskeletal manifestations of Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum.* **23**, 1121–1127 (1980).
22. Vasireddy, S., Talwalkar, A., Miller, H., Mehan, R. & Swinson, D. R. Patterns of pain in Paget's disease of bone and their outcomes on treatment with pamidronate. *Clin. Rheumatol.* **22**, 376–380 (2003).
23. Seton, M. Paget disease of bone: diagnosis and drug therapy. *Cleve Clin J Med* **80**, 452–462 (2013).
24. Monsell, E. M. *et al.* Hearing loss in Paget's disease of bone. *American Journal of Otology* **16**, (1995).
25. Hansen, M. F., Seton, M. & Merchant, A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2**, P58–63 (2006).
26. Hadjipavlou, A., Lander, P., Srolovitz, H. & Enker, I. P. Malignant transformation in Paget disease of bone. *Cancer* **70**, 2802–2808 (1992).
27. Del Pino Montes, J. *et al.* Enfermedad ósea de Paget, osteomalacia y sarcopenia. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* **11**, 3555–3566 (2014).
28. Seitz, S. *et al.* Paget's Disease of Bone: Histologic Analysis of 754 Patients. *J Bone Miner Res* **24**, 62–69 (2009).
29. Drake, W. M., Kendler, D. L. & Brown, J. P. Consensus statement on the modern therapy of Paget's disease of bone from a Western Osteoporosis Alliance symposium. Biannual Foothills Meeting on Osteoporosis, Calgary, Alberta, Canada, September 9-10, 2000. *Clin Ther* **23**, 620–626 (2001).
30. Selby, P. L. *et al.* Guidelines on the management of Paget's disease of bone. *Bone* **31**, 366–373 (2002).
31. Luckman, S. P. *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 581–589 (1998).

32. Parvizi, J., Klein, G. R. & Sim, F. H. Surgical management of Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2**, P75–82 (2006).
33. Cohen Jr., M. M. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet.* **140A**, 2646–2706 (2006).
34. Zaidi, M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* **13**, 791–801 (2007).
35. Rucci, N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab* **5**, 49–56 (2008).
36. Suda, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345–357 (1999).
37. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342 (2003).
38. Theill, L. E., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 795–823 (2002).
39. Kostenuik, P. J. & Shalhoub, V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 613–635 (2001).
40. Stenbeck, G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 285–292 (2002).
41. Nesbitt, S. A. & Horton, M. A. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* **276**, 266–269 (1997).
42. Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *J. Cell. Sci.* **113 (Pt 3)**, 377–381 (2000).
43. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269 (2005).
44. Gakidis, M. A. M. *et al.* Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J. Cell Biol.* **166**, 273–282 (2004).
45. Bustelo, X. R. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**, 6372–6381 (2001).
46. Turner, M. & Billadeau, D. D. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 476–486 (2002).
47. Faccio, R. *et al.* Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* **11**, 284–290 (2005).

48. Weinstein, R. S. *et al.* Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **109**, 1041–1048 (2002).
49. Del Pino Montes, J. La enfermedad de Paget: la historia interminable. *Reumatol Clin* **3 Suppl 1**, S13–17 (2007).
50. Barker, D. J. & Gardner, M. J. Distribution of Paget's disease in England, Wales and Scotland and a possible relationship with vitamin D deficiency in childhood. *Br J Prev Soc Med* **28**, 226–232 (1974).
51. Siris, E. S. Epidemiological aspects of Paget's disease: family history and relationship to other medical conditions. *Semin. Arthritis Rheum.* **23**, 222–225 (1994).
52. Lever, J. H. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: a speculative hypothesis. *Bone* **31**, 434–436 (2002).
53. Merlotti, D. *et al.* Characteristics and familial aggregation of Paget's disease of bone in Italy. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1356–1364 (2005).
54. López-Abente, G., Morales-Piga, A., Elena-Ibáñez, A., Rey-Rey, J. S. & Corres-González, J. Cattle, pets, and Paget's disease of bone. *Epidemiology* **8**, 247–251 (1997).
55. O'Driscoll, J. B. & Anderson, D. C. Past pets and Paget's disease. *Lancet* **2**, 919–921 (1985).
56. Mills, B. G. & Singer, F. R. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. *Science* **194**, 201–202 (1976).
57. Rebel, A. *et al.* Ultrastructural characteristics of osteoclasts in Paget's disease. *Rev Rhum Mal Osteoartic* **41**, 767–771 (1974).
58. Mills, B. G. *et al.* Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 303–311 (1984).
59. Morales-Piga, A. A., Rey-Rey, J. S., Corres-González, J., García-Sagredo, J. M. & López-Abente, G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 663–670 (1995).
60. Siris, E. S., Ottman, R., Flaster, E. & Kelsey, J. L. Familial aggregation of Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 495–500 (1991).
61. Morissette, J., Laurin, N. & Brown, J. P. Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2**, P38–44 (2006).
62. Ralston, S. H. & Albagha, O. M. E. Genetics of Paget's disease of bone.

Curr Osteoporos Rep **12**, 263–271 (2014).

63. Albagha, O. M. E. *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* **42**, 520–524 (2010).

64. Singer, F. R. Paget's disease of bone—genetic and environmental factors. *Nat Rev Endocrinol* **advance online publication**, (2015).

65. Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. & Fryer, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* **482**, 21–26 (2001).

66. Strange, R. C., Jones, P. W. & Fryer, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* **112-113**, 357–363 (2000).

67. Frova, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* **23**, 149–169 (2006).

68. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**, 1001–1004 (2009).

69. McManus, S. & Roux, S. The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. *J Mol Signal* **7**, 1 (2012).

70. Seibenhener, M. L., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* **581**, 175–179 (2007).

71. Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. & Wooten, M. W. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 95–100 (2007).

72. Layfield, R. & Shaw, B. Ubiquitin-mediated signalling and Paget's disease of bone. *BMC Biochemistry* **8**, S5 (2007).

73. Ciani, B., Layfield, R., Cavey, J. R., Sheppard, P. W. & Searle, M. S. Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J. Biol. Chem.* **278**, 37409–37412 (2003).

74. Tsakiri, E. N. & Trougakos, I. P. The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging. *Int Rev Cell Mol Biol* **314**, 171–237 (2015).

75. Buchberger, A. From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol.* **12**, 216–221 (2002).

76. Seibenhener, M. L. *et al.* Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8055–8068 (2004).

77. Rea, S. L., Walsh, J. P., Layfield, R., Ratajczak, T. & Xu, J. New insights

into the role of sequestosome 1/p62 mutant proteins in the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Endocr. Rev.* **34**, 501–524 (2013).

78. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776 (2000).

79. Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205–219 (2004).

80. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 405–413 (2007).

81. Jin, Z. *et al.* Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **137**, 721–735 (2009).

82. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).

83. Donohue, E., Balgi, A. D., Komatsu, M. & Roberge, M. Induction of Covalently Crosslinked p62 Oligomers with Reduced Binding to Polyubiquitinated Proteins by the Autophagy Inhibitor Verteporfin. *PLoS ONE* **9**, e114964 (2014).

84. Ichimura, Y. & Komatsu, M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* **32**, 431–436 (2010).

85. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* **9**, 859–864 (2008).

86. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).

87. Yip, K. H. M., Feng, H., Pavlos, N. J., Zheng, M. H. & Xu, J. p62 ubiquitin binding-associated domain mediated the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced osteoclast formation: a new insight into the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Am. J. Pathol.* **169**, 503–514 (2006).

88. Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M. & Xu, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin. Biochem.* **45**, 863–873 (2012).

89. Li, J. *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 1566–1571 (2000).

90. Skaug, B., Jiang, X. & Chen, Z. J. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 769–796 (2009).

91. Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H. & Moscat, J. The atypical PKC-

interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* **19**, 1576–1586 (2000).

92. Durán, A. *et al.* The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev. Cell* **6**, 303–309 (2004).

93. Long, J. *et al.* Dimerisation of the UBA Domain of p62 Inhibits Ubiquitin Binding and Regulates NF-κB Signalling. *Journal of Molecular Biology* **396**, 178–194 (2010).

94. Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Payá, C. V. & Moscat, J. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2180–2188 (1999).

95. Lamothe, B. *et al.* Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4102–4112 (2007).

96. Grigoriadis, A. E. *et al.* c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**, 443–448 (1994).

97. Theoleyre, S. *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 457–475 (2004).

98. Kawai, K., Saito, A., Sudo, T. & Osada, H. Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *J. Biochem.* **143**, 765–772 (2008).

99. Sudo, T., Maruyama, M. & Osada, H. p62 functions as a p38 MAP kinase regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 521–525 (2000).

100. Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267–271 (1996).

101. Jin, W. *et al.* Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest* **118**, 1858–1866 (2008).

102. Wooten, M. W. *et al.* Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 6783–6789 (2008).

103. Kim, J. Y. & Ozato, K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J. Immunol.* **182**, 2131–2140 (2009).

104. Ang, E. *et al.* Proteasome inhibitors impair RANKL-induced NF-kappaB activity in osteoclast-like cells via disruption of p62, TRAF6, CYLD, and IkappaBalpha signaling cascades. *J. Cell. Physiol.* **220**, 450–459 (2009).

105. Ralston, S. H. & Layfield, R. Pathogenesis of Paget Disease of Bone.

Calcif Tissue Int **91**, 97–113 (2012).

106. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458–467 (2009).

107. Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* **22**, R29–R34 (2012).

108. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).

109. Eskelinen, E.-L. & Saftig, P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 664–673 (2009).

110. Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* **19**, 983–997 (2013).

111. Reddy, S. V. *et al.* Measles virus nucleocapsid transcript expression is not restricted to the osteoclast lineage in patients with Paget's disease of bone. *Exp. Hematol.* **27**, 1528–1532 (1999).

112. Helfrich, M. H. *et al.* A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 2315–2329 (2000).

113. Rima, B. K., Gassen, U., Helfrich, M. H. & Ralston, S. H. The pro and con of measles virus in Paget's disease: con. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 2290–2292; author reply 2293 (2002).

114. Sieradzan, K. A. *et al.* Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp. Neurol.* **156**, 92–99 (1999).

115. Zatloukal, K. *et al.* p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am. J. Pathol.* **160**, 255–263 (2002).

116. Bolland, M. J. *et al.* Delayed development of Paget's disease in offspring inheriting SQSTM1 mutations. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 411–415 (2007).

117. Daroszewska, A. *et al.* A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSTM1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2734–2744 (2011).

118. Chamoux, E. *et al.* The p62 P392L mutation linked to Paget's disease induces activation of human osteoclasts. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1668–1680 (2009).

119. Collet, C. *et al.* Paget's Disease of Bone in the French Population: Novel SQSTM1 Mutations, Functional Analysis, and Genotype–Phenotype Correlations. *J Bone Miner Res* **22**, 310–317 (2007).

120. Moyzis, R. K. *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6622–6626 (1988).
121. Blackburn, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53–56 (2000).
122. Baumann, P. & Cech, T. R. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171–1175 (2001).
123. Gasser, S. M. A sense of the end. *Science* **288**, 1377–1379 (2000).
124. O’Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181 (2010).
125. Deng, Y., Chan, S. S. & Chang, S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* **8**, 450–458 (2008).
126. Aubert, G. & Lansdorp, P. M. Telomeres and Aging. *Physiological Reviews* **88**, 557–579 (2008).
127. Vaziri, H. *et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9857–9860 (1994).
128. Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011–2015 (1994).
129. Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C. & Hoffman, A. R. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* **58**, 4168–4172 (1998).
130. Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Tanaka, M. & Inoue, M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int. J. Cancer* **80**, 60–63 (1999).
131. Ueda, M. *et al.* Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res.* **57**, 370–374 (1997).
132. Norrback, K. F. & Roos, G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. *Eur. J. Cancer* **33**, 774–780 (1997).
133. Cohen, S. B. *et al.* Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**, 1850–1853 (2007).
134. Donate, L. E. & Blasco, M. A. Telomeres in cancer and ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 76–84 (2011).
135. Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Mason, P. J. & Dokal, I. Very short

telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**, 353–357 (2001).

136. Sanders, J. L. & Newman, A. B. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiol Rev* (2013). doi:10.1093/epirev/mxs008

137. Fujii, H., Shao, L., Colmegna, I., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 4360–4365 (2009).

138. Tamayo, M. *et al.* Individual telomere length decay in patients with spondyloarthritis. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* **765C**, 1–5 (2014).

139. Armanios, M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J. Clin. Invest.* **123**, 996–1002 (2013).

140. Pignolo, R. J. *et al.* Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis. *Aging Cell* **7**, 23–31 (2008).

141. Saeed, H. *et al.* Telomerase-deficient mice exhibit bone loss owing to defects in osteoblasts and increased osteoclastogenesis by inflammatory microenvironment. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1494–1505 (2011).

142. Rénier, J. C., Cronier, P. & Audran, M. A new anatomic index based on current knowledge for calculating the cumulative percentage of pagetic bone per subject and other parameters. *Rev Rhum Engl Ed* **62**, 355–358 (1995).

143. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).

144. Van Staa, T. P. *et al.* Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 465–471 (2002).

145. Wermers, R. A., Tiegs, R. D., Atkinson, E. J., Achenbach, S. J. & Melton, L. J. Morbidity and mortality associated with Paget's disease of bone: a population-based study. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 819–825 (2008).

146. Judit García Aparicio. *Tesis doctoral: 'Valoración del riesgo cardiovascular en los pacientes con Enfermedad ósea de Paget (EOP) en Salamanca'*. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 2009

147. Svensson, J. *et al.* Leukocyte telomere length is not associated with mortality in older men. *Exp. Gerontol.* **57**, 6–12 (2014).

148. Gu, Y. *et al.* Mediterranean diet and leukocyte telomere length in a multi-ethnic elderly population. *Age (Dordr)* **37**, 24 (2015).

149. Nilsson, P. M., Tufvesson, H., Leosdottir, M. & Melander, O. Telomeres

and cardiovascular disease risk: an update 2013. *Transl Res* **162**, 371–380 (2013).

150. De Meyer, T., Rietzschel, E. R., De Buyzere, M. L., Van Criekinge, W. & Bekaert, S. Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends? *Ageing Res. Rev.* **10**, 297–303 (2011).

151. Armanios, M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J. Clin. Invest.* **123**, 996–1002 (2013).

152. Matsubara, Y. *et al.* Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 128–131 (2006).

153. Njajou, O. T. *et al.* A common variant in the telomerase RNA component is associated with short telomere length. *PLoS ONE* **5**, e13048 (2010).

154. Franco, S., Alsheimer, M., Herrera, E., Benavente, R. & Blasco, M. A. Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 335–340 (2002).

155. Schoeftner, S. & Blasco, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **10**, 228–236 (2008).

156. García-Beccaria, M., Martínez, P., Flores, J. M. & Blasco, M. A. In vivo role of checkpoint kinase 2 in signaling telomere dysfunction. *Ageing Cell* **13**, 810–816 (2014).

157. Gonzalo, S. *et al.* DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 416–424 (2006).

158. Blasco, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 299–309 (2007).

159. Rebel, A. *et al.* Ultrastructural characteristics of osteoclasts in Paget's disease. *Rev Rhum Mal Osteoartic* **41**, 767–771 (1974).

160. Ye, Z. & Song, H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **41**, 980–989 (2005).

161. Parl, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Letters* **221**, 123–129 (2005).

162. Brind, A. M. *et al.* The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.* **39**, 478–483 (2004).

163. Miller, E. A. *et al.* Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function:

the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* **171**, 265–272 (2003).

164. Fujita, N. *et al.* The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2092–2100 (2008).

165. Cheng, J.-F., Ning, Y.-J., Zhang, W., Lu, Z.-H. & Lin, L. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1258–1266 (2010).

166. Lacher, M. *et al.* Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatr.* **98**, 1835–1840 (2009).

167. Murthy, A. *et al.* A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* **506**, 456–462 (2014).

168. Pyo, J.-O., Nah, J. & Jung, Y.-K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* **44**, 73–80 (2012).

169. Songane, M. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PLoS ONE* **7**, e41618 (2012).

170. Gateva, V. *et al.* A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **41**, 1228–1233 (2009).

171. Bendre, M. S. *et al.* Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* **33**, 28–37 (2003).

172. Hsu, Y.-L. *et al.* Phospholipase D signaling pathway is involved in lung cancer-derived IL-8 increased osteoclastogenesis. *Carcinogenesis* **31**, 587–596 (2010).

173. Corral-Gudino, L., del Pino-Montes, J., García-Aparicio, J., Alonso-Garrido, M. & González-Sarmiento, R. Paget's disease of bone is not associated with common polymorphisms in interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha genes. *Cytokine* **52**, 146–150 (2010).

174. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).

175. Ralston, S. H. & Albagha, O. M. E. Genetic determinants of Paget's disease of bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1240**, 53–60 (2011).

176. Cooper, C. *et al.* Epidemiology of Paget's disease of bone. *Bone* **24**, 3S–5S (1999).

177. Hocking, L. J. *et al.* Domain-specific mutations in sequestosome 1

(SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2735–2739 (2002).

178. Falchetti, A. *et al.* Genetic epidemiology of Paget's disease of bone in Italy: sequestosome1/p62 gene mutational test and haplotype analysis at 5q35 in a large representative series of sporadic and familial Italian cases of Paget's disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* **84**, 20–37 (2009).

179. Michou, L. *et al.* Novel SQSTM1 mutations in patients with Paget's disease of bone in an unrelated multiethnic American population. *Bone* **48**, 456–460 (2011).

180. Rea, S. L. *et al.* Sequestosome 1 mutations in Paget's disease of bone in Australia: prevalence, genotype/phenotype correlation, and a novel non-UBA domain mutation (P364S) associated with increased NF-kappaB signaling without loss of ubiquitin binding. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1216–1223 (2009).

181. Hiruma, Y. *et al.* A SQSTM1/p62 mutation linked to Paget's disease increases the osteoclastogenic potential of the bone microenvironment. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3708–3719 (2008).

182. Falchetti, A. *et al.* Two novel mutations at exon 8 of the Sequestosome 1 (SQSTM1) gene in an Italian series of patients affected by Paget's disease of bone (PDB). *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1013–1017 (2004).

183. Chung, P. Y. J. *et al.* Founder effect in different European countries for the recurrent P392L SQSTM1 mutation in Paget's Disease of Bone. *Calcif. Tissue Int.* **83**, 34–42 (2008).

184. Falchetti, A. *et al.* Segregation of a M404V mutation of the p62/sequestosome 1 (p62/SQSTM1) gene with polyostotic Paget's disease of bone in an Italian family. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R1289–1295 (2005).

185. Layfield, R. *et al.* Structural and functional studies of mutations affecting the UBA domain of SQSTM1 (p62) which cause Paget's disease of bone. *Biochemical Society Transactions* **32**, 728–730 (2004).

186. Visconti, M. R. *et al.* Mutations of SQSTM1 are associated with severity and clinical outcome in paget disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 2368–2373 (2010).

187. Rubino, E. *et al.* SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **79**, 1556–1562 (2012).

188. Rea, S. L., Majcher, V., Searle, M. S. & Layfield, R. SQSTM1 mutations – Bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Experimental Cell Research* **325**, 27–37 (2014).

189. Van der Zee, J. *et al.* Rare mutations in SQSTM1 modify susceptibility to frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* **128**, 397–410 (2014).

190. Fecto F, Yan J, Vemula S & et al. SQstm1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **68**, 1440–1446 (2011).
191. Hirano, M. *et al.* Mutations in the gene encoding p62 in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **80**, 458–463 (2013).
192. Kuusisto, E., Salminen, A. & Alafuzoff, I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* **12**, 2085–2090 (2001).
193. Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* **10**, 661–670 (2014).
194. Warren, J. D., Rohrer, J. D. & Rossor, M. N. Frontotemporal dementia. *The BMJ* **347**, f4827 (2013).
195. Fuentes, P., Slachevsky, A., Reyes, P. & Cartier, L. Frontotemporal dementia non familial and generalized epilepsy. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* **63**, 1016–1020 (2005).
196. Sperfeld, A. D. *et al.* FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann. Neurol.* **46**, 708–715 (1999).
197. Wyllie, W. G. The Occurrence in Osteitis Deformans of Lesions of the Central Nervous System, with a Report of Four Cases. *Brain* **46**, 336–351 (1923).
198. Notkin, J. Psychosomatic implications in a case of Paget's disease with psychosis. *Psychiatr Q* **26**, 307–312 (1952).
199. Kateryniuk, N. Depressive reaction in a case of osteitis deformans (Paget's disease). *J Ky Med Assoc* **64**, 507–508 (1966).
200. KAUFMAN M. PSychois in paget's disease (osteitis deformans). *Arch NeurPsych* **21**, 828–837 (1929).

DIFUSIÓN DE RESULTADOS



TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Usategui-Martín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, González Sarmiento R. **VAV3 gene polymorphism is associated with Paget Disease of Bone.**

Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2016.

Usategui-Martín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, González Sarmiento R. **Polymorphisms in autophagy genes are associated with Paget Disease of Bone.**

PLoS ONE. 2015.

Usategui-Martín R, Corral E, Alonso M, Calero-Paniagua I, Carranco-Medina TE, Quesada-Moreno A, et al. **Estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y del polimorfismo Ile105Val del gen GSTP1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget.**

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral. 2014.

TRABAJOS SOMETIDOS A PUBLICACIÓN EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Usategui-Martín R, Calero-Paniagua I, Del Pino- Montes J, González-Sarmiento R. **Paget's Disease of bone is associated with shortening of telomere length**

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Usategui Martín R, Calero Paniagua I, Carranco Medina T, Quesada Moreno A, Montilla Morales C, del Pino Montes J, González Sarmiento R. **“Análisis del polimorfismo rs7528153 del gen VAV3 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”.**

XIX Congreso de la sociedad española de investigación ósea y del metabolismo mineral (SEIOMM). Noviembre 2014. Santiago de Compostela, España

R. Usategui Martín, I. Calero Paniagua, T. Carranco Medina, A. Quesada Moreno, J. Del Pino Montes, R. González Sarmiento. **“Caracterización de una nueva mutación en el exón 6 del gen SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**

XVIII Congreso de la sociedad española de investigación ósea y del metabolismo mineral (SEIOMM). Noviembre 2013. Tarragona, España

COMUNICACIONES TIPO PÓSTER EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

R. Usategui-Martin, I. Calero Paniagua, T. Carranco Medina, A. Quesada Moreno, L. Pérez Garrido, M. Sánchez González, C. Hidalgo Calleja, C. Montilla Morales, J. Del Pino Montes - R. González Sarmiento. **“Análisis de la longitud telomérica en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**

XX Congreso de la sociedad española de investigación ósea y del metabolismo mineral (SEIOMM). Octubre 2015, Bilbao, España

R. Usategui-Martin, I. Calero Paniagua, T. Carranco Medina, A. Quesada Moreno, L. Pérez Garrido, M. Sánchez González, C. Hidalgo Calleja, C. Montilla Morales, J. Del Pino Montes - R. González Sarmiento **“p.E273D y p.A426V, dos nuevos polimorfismos en el gen SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**.

XX Congreso de la sociedad española de investigación ósea y del metabolismo mineral (SEIOMM). Octubre 2015, Bilbao, España.

R. Usategui-Martin, I. Aurrekoetxea-Rodríguez, J. Fernández-Mateos, I. Calero-Paniagua, J. Del Pino-Montes, R. González-Sarmiento. **“Description of a new polymorphism in SQSTM1 gene in patients with Paget’s Disease of Bone”**

“European Society of Human Genetic Conference”. Junio 2015. Glasgow, Scotland, United Kingdom.

R. Usategui-Martín, I. Calero Paniagua, T. Carranco Medina, A. Quesada Moreno, L. Pérez Garrido, M. Sánchez González, C. Hidalgo Calleja, C. Montilla Morales, J. del Pino Montes y R. González Sarmiento. **“Descripción de un nuevo polimorfismo en el gen SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**

41º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Mayo 2015. Sevilla.

Usategui R, Calero I, Carranco T, Quesada A, Montilla C, Pino J del, González R **“Estudio de variantes alélicas de genes implicados en autofagia en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**

XIX Congreso de la sociedad española de investigación ósea y del metabolismo mineral (SEIOMM). Noviembre 2014. Santiago de Compostela, España

Rivero-Perdomo, V.; Usategui-Martín, R.; Del Pino-Montes. J.; González-Sarmiento, R. **“Study of ATG2B and ATG16L1 polymorphisms in Spanish patients with Paget’s Disease of Bone”**

“European Society of Human Genetic Conference”. Mayo 2014. Milán, Italia

R. Usategui Martín, I. Calero Paniagua, T. Carranco Medina , A. Quesada Moreno, A.J. Plata Izquierdo , M. Sánchez González , S. Gómez Castro, C. Hidalgo Calleja , C. Montilla Morales , J. Del Pino Montes - R. González Sarmiento **“Incidencia de mutaciones en el gen del SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget de la provincia de Salamanca”**

40º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Mayo 2014. Santiago de Compostela.

Usategui Martín, Ricardo; López Bartolomé, Mónica; Bueno Martínez, Elena; Del Pino Montes, Javier; González Sarmiento, Rogelio **“Identification of new SQSTM1 mutations in familiar Paget’s Disease”**

“European Society of Human Genetic Conference”. Junio 2013. Paris, Francia.

Usategui Martín, Ricardo, Del Pino Montes, Javier, González Sarmiento, Rogelio. **“Estudio molecular del gen SQSTM1 en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget”**

XXVII Congreso Nacional de la Asociación de Genética Humana. Abril 2013. Madrid, España.



Usategui-Martín R^{1,2}, Corral E¹, Alonso M¹, Calero-Paniagua I^{2,3}, Carranco-Medina TE^{2,3}, Quesada-Moreno A^{2,3}, Sánchez-González MD^{2,3}, Hidalgo-Calleja C^{2,3}, Pérez-Garrido L^{2,3}, Montilla Morales C^{2,3,4}, Mirón-Canelo JA⁵, González-Sarmiento R^{1,2,4}, del Pino-Montes J^{2,3,4}

1 Unidad de Medicina Molecular - Departamento de Medicina - Universidad de Salamanca

2 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

3 Servicio de Reumatología - Hospital Universitario de Salamanca

4 Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF)

5 Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica - Universidad de Salamanca

Estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 en pacientes con enfermedad ósea de Paget

Correspondencia: Javier del Pino Montes - Servicio de Reumatología - Hospital Universitario de Salamanca - Pº San Vicente, 182 - 37007 Salamanca (España)

Correo electrónico: jpino@usal.es

Fecha de recepción: 29/08/2014

Fecha de aceptación: 23/11/2014

Resumen

Fundamento: La enfermedad ósea de Paget (EOP) es un trastorno focal del hueso con aumento el número, tamaño y actividad de los osteoclastos. Algunos datos epidemiológicos apoyan la teoría de su relación con agentes ambientales tóxicos o infecciosos. Su interacción con algunas alteraciones genéticas predisponentes conducirían a la EOP. Las glutatión-S-transferasas (GST) intervienen en la metabolización de toxinas, al catalizar el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. Estudiamos si la variabilidad de los genes GSTM1, GSTP1 y GSTT1 se relaciona con el riesgo a desarrollar EOP.

Pacientes y métodos: Analizamos a 148 pacientes diagnosticados de EOP y a 207 individuos controles pareados en sexo y edad sin antecedentes de alteraciones óseas. Con DNA genómico obtenido de sangre periférica se estudió la presencia-ausencia de deleción en los genes GSTM1 y GSTT1, mediante PCR multiplex. El estudio del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 se llevó a cabo mediante PCR y posterior digestión con la enzima de restricción BsmI. Se analizó la distribución de genotipos mediante el test chi-cuadrado de Pearson. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas, realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. Utilizamos el programa SPSS 21.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas con valores de $p < 0,05$.

Resultados: Encontramos diferencias en la distribución de la presencia-ausencia de deleción en el gen GSTM1; no ser portador de la deleción o serlo en heterocigosis en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP (OR=0,56, IC 95%: 0,36-0,87; $p=0,011$). En el estudio de los genes GSTT1 y GSTP1 no hubo diferencias significativas.

Conclusión: La actividad detoxificadora disminuye cuando se heredan las dos copias delecionadas del gen GSTM1 al disminuir la actividad enzimática; se ha asociado con una mayor susceptibilidad para algunos tumores, hepatopatía alcohólica y otros problemas inflamatorios. No conocemos descripción de su asociación con la EOP. En los individuos portadores del gen GSTM1 delecionado en homocigosis se observa con más frecuencia EOP. Este hecho podría explicar los hallazgos epidemiológicos que asocian la EOP a la exposición a determinados agentes ambientales.

Palabras clave: enfermedad ósea de Paget, glutatión-S-transferasa, genética, polimorfismo.



Study of the deletions in the GSTM1 and GSTT1 genes and of the *Ile105Val* polymorphism of the GSTP1 gene in patients with Paget's disease of bone

Summary

Background: Paget's disease of bone (PDB) is a disorder focussed on the bone with an increase in the number, size and activity of the osteoclasts. Some epidemiological data support the theory of its relationship with toxic or infectious environmental agents, whose interaction with some predisposing genetic alterations may lead to PDB. The glutathione S-transferases (GST) are involved in the metabolism of toxins, by catalysing the nucleophilic attack of the physiological substrate, reduced glutathione or GSH (g-Glu-Cys-Gly) on the electrophilic centre of a great number of toxic structures. We studied whether the variability of the GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes is related to the risk of developing PDB.

Patients and methods: We analysed 148 patients diagnosed with PDB, and 207 control individuals matched in sex and age with no history of bone alterations. Using genomic DNA obtained from peripheral blood the presence-absence of the GSTM1 and GSTT1 genes was studied by means of multiplex PCR. The study of the *Ile105Val* GSTP1 gene was carried out using PCR and subsequent digestion with the restriction enzyme BsmAI. The distribution of genotypes was analysed by means of the Pearson chi-square test. When statistically significant differences were found we carried out a multivariate logistical regression to determine the risk which the presence of a particular genotype could generate. We used the C(SP)SS 21.0 program. Differences were considered to be statistically significant when the value of $p < 0.05$.

Results: We found differences in the distribution of the presence-absence of the deletion in the GSTM1 gene; not being a carrier for the deletion or being a heterozygous carrier in the GSTM1 gene confers a lower risk of developing PDB (OR=0.56, 95% CI: 0.36-0.87; $p=0.011$). In the study of the GSTT1 and GSTP1 genes there were no significant differences.

Conclusion: The detoxifying activity diminishes when two copies of the GSTM1 gene with deletions are inherited by reducing in enzyme activity, which has been associated with a greater susceptibility to some cancers, alcoholic hepatopathy and other inflammatory problems. We are not aware of any description of its association with PDB. PDB is observed more frequently in carriers of the homozygous deletion in the GSTM1 gene. This fact could explain the epidemiological findings which link PDB to exposure to certain environmental agents.

Key words: *Paget's disease of bone, glutathione S-transferase, genetics, polymorphism.*

Introducción

La enfermedad ósea de Paget (EOP) es la enfermedad metabólica ósea más frecuente después de la osteoporosis¹. Es un trastorno focal del hueso que se caracteriza por un aumento del recambio óseo de forma desorganizada, un gran incremento de la resorción ósea seguida de una formación ósea de la misma proporción. El resultado es un hueso con una estructura abigarrada y anárquica que altera su morfología y propiedades mecánicas. Algunos pacientes son asintomáticos, mientras que otros presentan dolor, artropatía degenerativa, fracturas, deformidad ósea, sordera u otros síndromes de compresión nerviosa. La alteración principal reside en los osteoclastos, que aumentan en número, tamaño y actividad^{2,3}.

Actualmente son dos las hipótesis etiopatogénicas que tratan de explicar el origen de la EOP: la influencia de factores ambientales y la existencia de condicionantes genéticos¹.

Hay evidencias de que alteraciones genéticas juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Hay una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%), con un riesgo relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre

los familiares de pacientes con EOP^{3,6}. En la mayor parte de las familias, la herencia tiene un patrón autosómico dominante con una alta penetrancia en la sexta década³. Recientemente se ha relacionado con un mayor riesgo a desarrollar EOP alteraciones en los genes SQSTM1, CSF1, OPTN, TNFRSF y TM7SF4^{7,8}.

Algunos datos epidemiológicos, como su distribución heterogénea o los cambios más recientes de su incidencia y gravedad apoyan la participación de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito su asociación con dietas pobres en calcio y vitamina D durante la infancia^{9,10}, exposición a toxinas ambientales¹¹, contacto con animales durante la infancia¹²⁻¹⁴, consumo de carne no controlada¹⁵, consumo de agua no tratada¹⁶ y con agentes infecciosos como los virus (*paramixoviridae*)^{14,17,18}.

Ni los factores ambientales ni los genéticos explican por separado su etiopatogenia. El modelo más aceptado considera a la EOP como el resultado de la actuación sinérgica de factores ambientales y genéticos. El condicionamiento genético explicaría la susceptibilidad individual a desarrollar la enfermedad tras la participación del factor ambiental participante².



En la metabolización de toxinas intervienen las glutatión-S-transferasas (GST), las GST constituyen una familia de enzimas que intervienen en la detoxificación celular. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas, permitiendo su degradación. Se clasifican en siete familias (*alpha*, *kappa*, *mu*, *pi*, *sigma*, *theta* y *zeta*) que se diferencian tanto en su secuencia, como en sus propiedades inmunológicas y papel fisiológico^{19,20}. GSTM1, GSTP1 y GSTT1 son las GST más estudiadas y las que con mayor frecuencia se han relacionado con patologías humanas²¹.

Parece ser importante en el desarrollo de la enfermedad el papel de los factores ambientales, entre ellos algunos tóxicos. Puesto que la respuesta individual a los factores tóxicos está condicionada genéticamente, hemos diseñado este estudio con el objetivo de intentar caracterizar si la variabilidad de los genes GSTM1, GSTP1 y GSTT1 (implicados en la metabolización de toxinas exógenas) se relaciona con el riesgo a desarrollar EOP.

Material y métodos

Pacientes y controles

Hemos estudiado a 148 pacientes diagnosticados de EOP. En el caso de pacientes con antecedentes familiares, sólo hemos seleccionado un paciente por familia para evitar el sesgo genotípico familiar. Los pacientes fueron diagnosticados en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Salamanca. Como grupo control, hemos analizado a 207 individuos pareados en sexo y edad con el grupo de pacientes, sin antecedentes de alteraciones óseas, y procedentes de la misma área geográfica. De cada uno de los pacientes se recogieron características clínicas como sexo, edad de diagnóstico, historia familiar, número de huesos afectados, presencia de fracturas, afectación del cráneo y afectación del par craneal. Todos los sujetos estudiados, tanto del grupo de pacientes como del grupo control, firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio, que fue aprobado por el comité ético del hospital.

Extracción de DNA y análisis de polimorfismos

Tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, la extracción de DNA genómico de sangre periférica se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar de fenol-cloroformo.

El estudio de la presencia-ausencia de delección en los genes GSTM1 y GSTT1 se hizo mediante PCR multiplex utilizando las condiciones que se recogen en la tabla 1. El estudio del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 se llevó a cabo mediante PCR y posterior digestión con la enzima de restricción BsmI. Las condiciones utilizadas se recogen en la tabla 1.

Análisis estadístico

Se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test chi-cuadrado de Pearson. En aquellos polimorfismos en los que se

encontraron diferencias estadísticamente significativas, realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa SPSS 21.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas cuyo valor de p fue <0,05.

Resultados

Hemos estudiado un total de 148 pacientes y 207 controles. Las características clínicas de los pacientes están recogidas en la tabla 2. La distribución de la presencia-ausencia de la delección en los genes GSTM1 y GSTT1 y la distribución de los genotipos para el polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1; y su relación con el riesgo a desarrollar EOP se muestran en la tabla 3.

Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la presencia-ausencia de delección en el gen GSTM1; no ser portador de la delección en homocigosis en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP (OR=0,56, IC 95%: 0,36-0,87; p=0,011). En el estudio de los genes GSTT1 y GSTP1 no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las características clínicas de los pacientes frente a la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 Y GSTP1.

Discusión

Las lesiones de la EOP se producen como resultado de un aumento de la resorción ósea seguido de un aumento de la formación de hueso. La principal alteración se localiza en los osteoclastos que aumentan en número, tamaño y actividad. Hay varias evidencias que nos indican que la etiopatogenia de la enfermedad es la sinergia entre una serie de factores ambientales y la existencia de determinados condicionantes genéticos². Mediante el estudio de la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 (implicados en el metabolismo de toxinas exógenas) pretendimos evaluar la relación de estas variables génicas con el riesgo a desarrollar EOP. En lo conocido por nosotros, este es el primer trabajo que examina la influencia de la alteración de estos genes en el desarrollo de la enfermedad.

El gen GSTM se localiza en el cromosoma 1p13 y hasta el momento se conocen 5 variantes alélicas: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 y GSTM5. Se produce una disminución de la actividad detoxificadora cuando se hereda delecionado del gen GSTM1; es decir, ser portador en homocigosis de una delección en el gen GSTM1 causa una disminución de la actividad enzimática. La clase *theta* de las GST comprende dos genes que codifican dos proteínas GSTT1 y GSTT2. De igual modo que con el gen GSTM1, si se hereda en homocigosis una delección del gen GSTT1 se produce una disminución de la actividad detoxificadora. En cuanto a la subfamilia de GSTP comprende un único gen GSTP1 en el que se han descrito dos varian-



Tabla 1. Condiciones de amplificación y digestión para los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1

Condiciones de amplificación para los genes GSTM1 y GSTT1
Cebadores
<i>C(+)</i> :
Sentido: 5'-CGCCATCTTGTGCTACATTGCCCG-3'
<i>GSTM1</i> :
Sentido: 5'-ATCTTCTCCTCTTCTGTCTC-3'
Anti sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<i>GSTT1</i> :
Sentido: 5'-TTCCCTTACTGGTCCTACATCTC-3'
Anti sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
Programa de PCR
95°C 5 minutos
30 ciclos (94°C 30 segundos/58°C 30 segundos/72°C 45 segundos)
72°C 8 minutos
Fragmentos resultantes de PCR y correspondencia con el genotipo
231, 450 y 158 pb: GSTM1(+)/GSTT1(+)
231 y 158 pb: GSTM1(+)/GSTT1(-)
450 y 158 pb: GSTM1(-)/GSTT1(+)
158 pb: GSTM1(-)/GSTT1(-)
Condiciones de amplificación y digestión para el gen GSTP1
Cebadores
Sentido: 5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3'
Anti sentido: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'
Programa de PCR
95°C 5 minutos
30 ciclos (94°C 30 segundos/55°C 30 segundos/72°C 30 segundos)
72°C 5 minutos
Amplicón: 176pb
Enzima: BsmI Digestión: 37°C / 4 horas
Fragmentos resultantes de la digestión y correspondencia con el genotipo
176 pb: AA
176, 91 y 85 pb: AG
91 y 85 pb: GG

tes alélicas que difieren en la base 313 del cDNA, una adenina (A) por una guanina (G); esta diferencia produce un cambio de una valina (Val) por una isoleucina (Ile) en el codón 105 de la secuencia aminoacídica provocando una unión defectuosa de la enzima al sustrato, y con ello una disminución de la actividad detoxificadora^{19,20,22,23}.

Ser portador en homocigosis de delección en el gen GSTM1 y/o GSTT1 se ha asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de cáncer^{21,22,24}, enfermedad hepática por alcoholismo²⁵ y otras enfermedades de carácter inflamatorio^{25,26}, debido a que se produce una peor metabolización de agentes tóxicos, sintetizándose radicales libres que dañan el DNA²⁰. Nuestros resultados muestran que no ser portador en homocigosis de delección en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo de desarrollar EOP. En el estudio del gen GSTT1 y GSTP1 no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el de controles. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la clínica, extensión y actividad de la enfermedad frente a la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en el grupo de pacientes con EOP.

Una de las causas que se postulan como origen de la EOP es la exposición a toxinas ambientales procedentes de la industria del algodón, carnes o agua sin los adecuados controles sanitarios; que podrían alterar la maduración y actividad de los osteoclastos y así favorecer el desarrollo de EOP por un aumento de la actividad osteoclástica^{11,15,16}. Nuestra hipótesis es que tener el gen GSTM1 delecionado en homocigosis, supone una metabolización deficiente de las toxinas ambientales que, por un mecanismo aún desconocido, podría aumentar la función de los osteoclastos y precursores osteoclásticos, lo cual, junto con otras alteraciones genéticas aún no bien descritas, podrían desembocar en el desarrollo de EOP.

En conclusión, en los individuos portadores del gen GSTM1 delecionado en homocigosis se observa con más frecuencia EOP. Este hecho podría explicar los hallazgos epidemiológicos que asocian la EOP a la exposición a determinados agentes ambientales. Aún así, son necesarios estudios funcionales de estos polimorfismos para validar nuestra hipótesis.



Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con EOP

		Pacientes (N)
Sexo	Hombre Mujer	79 69
Edad de diagnóstico	Más de 60 años Menos de 60 años	115 33
Historia familiar	Esporádico Familiar	129 19
Nº de huesos afectados	Menos de tres Más de tres	103 45
Presencia de fracturas	Sí No	9 139
Afectación de cráneo	Sí No	61 87
Afectación de par craneal	Sí No	25 123

Tabla 3. Distribución de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 y su asociación con el riesgo a desarrollar EOP

SNP	Genotipo	Pacientes EOP N (%)	Controles N (%)	Valor de p	OR (IC 95%)
GSTM1	-/-	98 (66,2%)	109 (52,7%)	// 0,011	1,00
	+/+ ; +/-	50 (33,8%)	98 (47,3%)		0,56 (0,36-0,87)
GSTT1	-/-	28 (18,9%)	49 (23,7%)	0,299	----
	+/+ ; +/-	120 (81,1%)	158 (76,3%)		
GSTP1	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,280	----
	AG	65 (43,9)	97 (49,7%)		
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
	AA+AG	135 (91,2%)	173 (88,7%)	0,477	----
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,125	----
	AG+GG	78 (52,7%)	119 (61,0%)		

Bibliografía

- Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget Disease of Bone. *Calcif Tissue Int* 2012;91:97-113.
- Singer FR, Mills BG, Gruber HE, Windle JJ, Roodman GD. Ultrastructure of bone cells in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2006;21(Suppl 2):P51-4.
- Morales-Piga AA, Rey-Rey JS, Corres-González J, García-Sagredo JM, López-Abente G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1995;10:663-70.
- Morissette J, Laurin N, Brown JP. Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2006;21(Suppl 2):P38-44.
- Siris ES, Ottman R, Flaster E, Kelsey JL. Familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1991;6:495-500.
- Hocking LJ, Herbert CA, Nicholls RK, Williams F, Bennett ST, Cundy T, et al. Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet* 2001;69:1055-61.
- Albarga OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome wide association



- study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2010;42:520-4.
8. Albagha OME, Wani SE, Visconti MR, Alonso N, Goodman K, Brandi ML, et al. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2011;43:685-9.
 9. Barker DJ, Gardner MJ. Distribution of Paget's disease in England, Wales and Scotland and a possible relationship with vitamin D deficiency in childhood. *Br J Prev Soc Med* 1974;28:226-32.
 10. Siris ES. Epidemiological aspects of Paget's disease: family history and relationship to other medical conditions. *Semin Arthritis Rheum* 1994;23:222-5.
 11. Lever JH. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: a speculative hypothesis. *Bone* 2002;31:434-6.
 12. Merlotti D, Gennari L, Galli B, Martini G, Calabrò A, De Paola V, et al. Characteristics and familial aggregation of Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res* 2005;20:1356-64.
 13. López-Abente G, Morales-Piga A, Elena-Ibáñez A, Rey-Rey JS, Corres-González J. Cattle, pets, and Paget's disease of bone. *Epidemiology* 1997;8:247-51.
 14. O'Driscoll JB, Anderson DC. Past pets and Paget's disease. *Lancet* 1985;2:919-21.
 15. Mills BG, Singer FR. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. *Science* 1976;194:201-2.
 16. Mirón-Canelo JA, Del Pino-Montes J, Vicente-Arroyo M, Sáenz-González MC. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). The Paget's disease of the bone study group of Salamanca. *Eur J Epidemiol* 1997;13:801-5.
 17. Rebel A, Malkani K, Basle M, Bregeon C, Patezour A, Filmon R. Ultrastructural characteristics of osteoclasts in Paget's disease. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1974;41:767-71.
 18. Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Suffin SC, Stabile E, Holst P. Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1984;303:11.
 19. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:21-6.
 20. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 2000;112-113:357-63.
 21. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-9.
 22. Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41:980-9.
 23. Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol Eng* 2006;23:149-69.
 24. White DL, Li D, Nurgalieva Z, El-Serag HB. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;167:377-89.
 25. Brind AM, Hurlstone A, Edrington D, Gilmore I, Fisher N, Pirmohamed M, et al. The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease. *Alcohol* 2004;39:478-83.
 26. Miller EA, Pankow JS, Millikan RC, Bray MS, Ballantyne CM, Bell DA, et al. Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2003;171:265-72.

RESEARCH ARTICLE

Polymorphisms in Autophagy Genes Are Associated with Paget Disease of Bone

Ricardo Usategui-Martín¹, Judith García-Aparicio², Luis Corral-Gudino², Ismael Calero-Paniagua³, Javier Del Pino-Montes³, Rogelio González Sarmiento^{1,4}*

1 Unidad de Medicina Molecular-IBSAL, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca-Hospital Universitario de Salamanca-CSIC, Salamanca, España, **2** Servicio de Medicina interna-IBSAL, Hospital Universitario de Salamanca Universidad de Salamanca CSIC, Salamanca, España, **3** Servicio de Reumatología-IBSAL, Hospital Universitario de Salamanca-Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, España, **4** Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, España

☞ These authors contributed equally to this work.

* gonzalez@usal.es



OPEN ACCESS

Citation: Usategui-Martín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, González Sarmiento R (2015) Polymorphisms in Autophagy Genes Are Associated with Paget Disease of Bone. PLoS ONE 10(6): e0128984. doi:10.1371/journal.pone.0128984

Academic Editor: Srinivasa M Srinivasula, IISER-TVM, INDIA

Received: February 11, 2015

Accepted: May 4, 2015

Published: June 1, 2015

Copyright: © 2015 Usategui-Martín et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by FIS PI 13/01741 (project belonging to Carlos III Institute, Government of Spain).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Paget disease of bone (PDB) is a focal bone disorder affecting the skeleton segmentally. The main alteration resides in osteoclasts that increase in size, number and activity. Many osteoclasts have cytoplasmic inclusions that have been associated with protein aggregates, increasing the evidences of a possible deregulation of autophagy in the development of the PDB. Autophagy starts with encapsulation of the target into a double-membrane-bound structure called an “autophagosome.” It has been reported that at least 18 ATG genes (autophagy-related genes) are involved in autophagosome formation. We have studied the distribution of genotypes of the ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms in a Spanish cohort of subjects with PDB and compared with healthy subjects. Our results show that being a carrier of the C allele of the ATG16L1 rs2241880 and the G allele of ATG5 rs2245214 polymorphisms were associated with an increased risk of developing PDB, whereas being a carrier of the T allele of ATG10 rs1864183 polymorphism decreased the risk of suffering the disease in our series. This is the first report that shows an association between autophagy and Paget Disease of Bone and requires further confirmation in other series.

Introduction

Paget's disease of bone (PDB) is a focal disorder of bone that affects segmentally the skeleton. The main alteration resides in osteoclasts that increase in size, number and activity. A change occurs in bone remodelling consisting in an increase in bone resorption followed by an excessive bone formation that results in a variegated and anarchic bone structure that alters the mechanical properties [1,2]. Currently, PDB is the most common metabolic bone disease after osteoporosis [3].

Two are the etiopathogenic hypotheses that attempt to explain the origin of the PDB: the influence of environmental factors and the existence of genetic factors [1,2]. Several environmental agents have been postulated as possible etiologic factors in the PDB. The most frequently environmental agents implicated are the infectious agents, especially viruses due to the fact that in the cytoplasm of many osteoclasts were observed structures that have been associated with viral nucleocapsids. [1,4]. It has been proposed also that these structures could be protein aggregates similar to those seen in neurodegenerative diseases [1,5,6], increasing the evidences of a possible deregulation of autophagy in the development of the PDB [1,7].

Between 20–40% of patients with a positive family history of the disease and 5–10% of sporadic patients are carriers of a mutation in the sequestosome1 gene (SQSTM1) which encodes the p62 protein [8,9]. The p62 protein plays an important role in cellular signals crossroads related with the activation of the NF- κ B pathway [10] and autophagy [11,12]. The p62 protein has a size of 434 aminoacids (62kDa) and it consists in different domains. Between the two PEST domains is a LIR domain, which interacts with the LC3 protein that allows the anchoring of p62 to the autophagosome, facilitating the degradation of ubiquitinated proteins [13,14].

Autophagy is a catabolic process responsible for the degradation of damaged organelles, cytoplasmic proteins and protein aggregates. It starts with the formation of the “autophagosome”, a double membrane structure in which the target is encapsulated. “Autophagosomes” fuse with lysosomes containing hydrolases that are responsible for degrading its contents [15–17]. Molecular studies in *saccharomyces cerevisiae* have identified at least 18 ATG genes (autophagy-related genes) involved in autophagosome formation [16–18].

There are several evidences that suggest that the development of PDB may be related to a deregulation of autophagy. Genetic variants of several genes involved in the process of autophagy such as SQSTM1, VCP and OPTN have been linked with PDB [1]. Moreover, it has been recently reported that mice with SQSTM1 mutation and that develop a PDB phenotype have increased expression of genes involved in autophagy such as SQSTM1, ATG5 and LC3 [1,7]. In patients with PDB, the p62 protein is over-expressed regardless of the SQSTM1 mutation status, suggesting that there could be a decrease in autophagy [19,20].

The aim of our study was to characterize whether polymorphisms in genes involved in autophagy would modify the risk of developing PDB. We have studied ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms to evaluate their putative role in the susceptibility of suffering PDB in a cohort of Spanish patients.

Materials and Methods

Subjects

We have studied 238 patients with PDB from the province of Salamanca, Spain. According to the prevalence of PDB [3] we calculated that a series of 152 patients would be representative of our PDB population. In the familial cases we have included only one affected patient of each family. Patients were recruited in the Metabolic Bone Unit at the University Hospital of Salamanca between January 1990 and February 2014. As a control group, 264 sex-matched healthy subjects over 40 years old without previous history of PDB were recruited to the same hospital during the same period of time. To confirm that the healthy subjects had not a silent PDB, we tested alkaline phosphatase levels and performed bone radiography to exclude bone affection. From each patient were collected clinical variables such as gender, age of diagnosis, family history, number of affected bones, presence of fractures, involvement of the skull and cranial nerve involvement. The study was approved by the local Ethics Committees of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain). The patients have signed an informed consent.

Table 1. Autophagy polymorphisms analysed in the study.

Gene	SNP ID	Base change	SNP	Chr location	Assay ID ^a	HWE ^b
ATG2B	rs3759601	C>G	Q1383E	14	c_9690166_10	>0.05
ATG16L1	rs2241880	T>C	T300A	2	c_9095577_20	>0.05
ATG10	rs1864183	C>T	T212M	5	c_11953871_20	>0.05
ATG5	rs2245214	C>G	Intronic	6	c_3001905_20	>0.05

^aAll the assays were commercially

^b HWE: Hardy-Weinberg equilibrium in control group

doi:10.1371/journal.pone.0128984.t001

DNA isolation and polymorphism genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard phenol/chloroform procedure. Genotyping of ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms was performed using TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assays (Table 1) that contain sequence-specific forward and reverse primers to amplify the polymorphic sequences and two probes labeled with VIC and FAM dyes to detect both alleles of each polymorphism [21]. PCR reactions were carried out using TaqMan universal PCR Maxter Mix following instructions in a Step-One Plus Real-time PCR system. To assess reproducibility, a random selected 5% of the samples were re-genotyped, all of these genotypes matched with genotypes initially designated. We have selected polymorphisms from ATG genes involved in autophagosome generation that have been previously reported in the literature. Initially, we selected non-synonym polymorphisms with a population frequency of the minor allele higher than 10% in Caucasian population and that were located in sequences highly conserved throughout the evolution. ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880 and ATG10 rs1864183 polymorphisms are missense mutations, whereas ATG5 rs2245214 polymorphism is intronic, but we selected this polymorphism because it was previously reported in the literature, the frequency of the minor allele was higher than 10% in Caucasians and because this polymorphism is associated with the lost of a recognition sites for SRp40 protein that is involved in mRNA splicing.

Statistical analyses

Healthy subjects group were tested for conformity to the Hardy-Weinberg equilibrium using chi-squared test for each polymorphism. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated for each polymorphic variant using unconditional logistic regression models to evaluate the association with PDB risk. These statistical analyses were performed using SPSS software. For the analysis, differences with a p-value < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

A total of 238 PDB patients and 264 healthy subjects were analysed. The clinical variables for each patient are summarized in Table 2. The distribution of genotypes of ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 and ATG5 rs2245214 polymorphisms in control samples were in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 1).

The genotypic frequencies and the result of the association analysis resulting from the study ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 and ATG5 rs2245214 polymorphisms in PDB and healthy subjects are summarized in Table 3. No significant differences

Table 2. Clinical characteristics of PDB patients.

		PDB PATIENTS
Gender	Man	132
	Woman	106
Age of diagnosis	Over 60 years	188
	Under 60 years	50
Family history	Sporadic	213
	Familial	25
Number of affected bones	Fewer than three	177
	More than three	61
Presence of fractures	Yes	17
	No	221
Involvement of the skull	Yes	90
	No	148
Cranial nerve involvement	Yes	33
	No	205

doi:10.1371/journal.pone.0128984.t002

Table 3. Genotypic frequencies of autophagy genes polymorphisms among cases and controls and the association with PDB risk.

SNP	Genotype	PDB Patients	Controls	p-value	OR (95% IC)
ATG2B rs3759601	CC	90 (37.8%)	110 (41.7%)		
	CG	120 (50.5%)	115 (43.6%)	0.276	
	GG	28 (11.8%)	39 (14.8%)		
	CC+CG	210 (88.2%)	225 (85.2%)	/	
	GG	28 (11.8%)	39 (14.8%)	0.322	
	CC	90 (37.8%)	110 (41.7%)	/	
ATG10 rs1864183	CG+GG	148 (62.2%)	154 (58.3%)	0.379	
	CC	100 (42%)	68 (25.8%)	/	1.00
	CT	107 (45%)	151(57.2%)	<0.001	0.48(0.32–0.71)
	TT	31 (13%)	45(17.0%)	0.007	0.46 (0.27–0.81)
	CC+CT	207 (87.0%)	219 (83.0%)	/	
	TT	31 (13.0%)	45 (17.0%)	0.211	
ATG16L1 rs2241880	CC	100 (42%)	68 (25.8%)	/	1.00
	CT+TT	138 (58%)	196 (74.2%)	<0.001	0.47 (0.32–0.69)
	TT	40 (16.8%)	63 (23.9%)	/	1.00
	TC	110 (46.2%)	138 (53.3%)	0.342	1.25 (0.78–2.00)
	CC	88 (37.0%)	63 (23.9%)	0.003	2.20 (1.31–3.66)
	TT+TC	150 (63%)	201 (76.1%)	/	1.00
ATG5 rs2245214	CC	88 (37%)	63 (23.9%)	0.001	1.87 (1.27–2.75)
	TT	40 (16.8%)	63 (23.9%)	/	
	TC+CC	198 (83.2%)	201 (76.1%)	0.052	
	CC	74 (31.1%)	106 (40.2%)		
	CG	128 (53.8%)	127 (48.1%)	0.094	
	GG	36 (13.1%)	31 (11.7%)		
ATG5 rs2245214	CC+CG	202 (84.9%)	233 (88.3%)	/	
	GG	36 (15.1%)	31 (11.7%)	0.267	
	CC	74 (31.1%)	106 (40.2%)	/	1.00
	CG+GG	164 (68.9%)	158 (59.8%)	0.035	1.48 (1.02–2.15)

Significant p-values are represented in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0128984.t003

Table 4. Allele frequencies of autophagy gene polymorphisms among cases and controls and the association with PDB risk.

SNP	Allele	PDB Patients	Controls	p-value	OR (95% IC)
ATG2B rs3759601	C	300 (63.0%)	335 (49.7%)		
	G	176 (37.0%)	193 (49.0%)	0.890	
ATG10 rs1864183	C	307 (64.5%)	287 (54.4%)	/	1.00
	T	169 (35.5%)	241 (45.6%)	0.001	0.65 (0.50–0.84)
ATG16L1 rs2241880	T	190 (39.9%)	264 (50.0%)	/	1.00
	C	286 (60.1%)	264 (50.0%)	0.001	1.50 (1.17–1.93)
ATG5 rs2245214	C	276 (58%)	339 (64.2%)	/	1.00
	G	200 (42%)	189 (35.8%)	0.044	1.30 (1.10–1.67)

Significant p-values are reprinted in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0128984.t004

Table 5. Haplotype distribution of ATG5 and ATG16L1 autophagy genes polymorphism among cases and controls and the association with PDB risk.

SNP	Allele	PDB Patients	Controls	p-value	OR (95% IC)
ATG16L1/ATG5	T/C	105 (44.1%)	146 (53.3%)	/	1.00
ATG16L1/ATG5	C/G	133 (53.9%)	118 (44.7%)	0.013	1.56 (1.10–2.23)

Significant p-values are reprinted in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0128984.t005

were found in genotypic distribution for ATG2B rs3759601 polymorphism between PDB group and healthy subjects. However, we found statistically significant differences in genotypic distribution for ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms. In the case of ATG10 rs1864183 polymorphism being a carrier of the variant allele T decreased the risk of developing PDB. Homozygous CC genotype of the ATG16L1 rs2241880 polymorphism was associated with increased risk of developing PDB. In the case of ATG5 rs2245214 polymorphism, codominance recessive analysis shows that be carriers of the G allele (CG+GG genotypes) confers an increased risk of developing PDB (Table 3).

The distribution of allelic frequencies for ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 and ATG5 rs2245214 polymorphisms are showed in Table 4. No significant differences were found in the allelic distribution for ATG2B rs3759601 polymorphism between PDB group and healthy subjects. However, we found statistically significant differences in allelic distribution for ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms between PDB patients and controls. In the case of ATG10 rs1864183 polymorphism being a carrier of allele T confers a decreased risk of developing PDB. Allele C of ATG16L1 rs2241880 polymorphism confers an increased risk of developing PDB. In the ATG5 rs2245214 polymorphism, allele G confers an increased risk of developing the disease (Table 4). Moreover, carrying the allele G and allele C of ATG5 rs2245214 and ATG16L1 rs2241880 polymorphisms increases the risk of developing PDB (Table 5).

No significant differences were found in the analysis of the different clinical forms and the genotypic distributions of the polymorphisms included in our study.

Discussion

Paget Disease of Bone (PDB) is consequence of an alteration in bone metabolism that increase bone resorption followed by an excessive compensatory bone formation [1]. The etiology of

PDB is unknown. Nevertheless, there are several observations that suggest that autophagy may be involved in the development of the disease [1]. Studying ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183 and ATG5 rs2245214 polymorphisms we attempted to evaluate the putative role of these variables in the susceptibility to PDB. Three polymorphisms are missense and produce amino acid changes (ATG2B rs3759601, ATG16L1 rs2241880, ATG10 rs1864183) and one is an intronic polymorphism (ATG5 rs2245214) (Table 1). We have selected ATG5, ATG10 and ATG16L1 because they code for proteins that form the ATG5-ATG12 conjugation complex along with ATG16L1, whereas ATG2B is necessary for closure of isolation membranes of autophagosomes.

The ATG16L1 gene is a central adaptor required for the formation of autophagosome [22]. ATG16L rs2241880 polymorphism has been associated with risk of developing Crohn disease [23–25]. We observed that in our series being a carrier of the homozygous CC genotype (p.300 Ala/Ala) is associated with an increased risk of developing PDB. It has been demonstrated that amino acids 296–299 in ATG16L1 constitute a caspase cleavage motif and the p. 300 Thr>Ala variant increased ATG16L sensitivity to caspase-3-mediated processing increasing the degradation of the p.300Ala variant of ATG16L1, resulting in diminished of autophagy [25]. It has been reported that decreased autophagy predisposes to suffer PDB [1,7,19,20]. Thus, being a carrier the CC genotype (Ala/Ala) of the ATG16L1 rs2241880 polymorphism represents a risk of developing PDB because the p.300Ala variant of ATG16L1 protein results in diminished autophagy and could increase the risk to suffer PDB in our series [25].

The ATG5-ATG16L1-ATG12 complex determines the sites of autophagosome synthesis regulating the targeting of LC3 to ATG5-ATG12. During autophagy, this complex will be degraded [16,17]. Mice that exhibit a PDB phenotype have increased expression of ATG5 that might indicate a decrease of autophagy in the course of the disease [7]. ATG5 rs2245214 polymorphism has been previously studied in patients with tuberculosis [26] and lupus erythematosus [27]. In our study being a carrier of the G allele increases the risk of developing PDB. We speculate with the possibility that carrying the G allele, that is located within an intron, could indirectly causes a decrease of autophagy or it could be linked to another exonic polymorphism not included in our study and therefore could predisposes to suffer PDB in our series.

It has been reported that down-regulation of ATG genes accelerate tumour development because decreased autophagy enhances tumour development [28,29]. In our study, being a carrier of the T allele of ATG10 rs1864183 polymorphism confers a decreased risk of developing PDB, being this association stronger in the group of subjects carrying the homozygous TT genotype. The T allele codes for a Methionine at codon 212 of ATG10. We could hypothesize that p.212Met variant of ATG10 protein increases autophagy decreasing the risk of developing the disease. Recent studies show that TT genotype of ATG10 rs1864183 polymorphism alters IL8 production [26]. It is well known that cytokines are involved in the interactions between the osteogenic cells in normal bone and IL-8 has been related with osteoclastogenesis and bone resorption [30,31]. In a previous report of 172 patients with PDB from Salamanca (Spain) we were unable to find significant differences in genotype or allelic frequencies between PDB patients and healthy subjects for the -251 IL8 polymorphism [32]. It would be of interest to analyse the levels of IL-8 in patients with EOP and relate them to the TT genotype of ATG10 rs1864183 polymorphism.

ATG2B is essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets [33]. This is the first study to investigate the ATG2B rs3759601 polymorphism. Our results show that genotype frequencies did not significantly differ between PDB patients and healthy subjects. This could reflect that variations in genotype of the ATG2B rs3759601 polymorphism do not modify autophagy.

We did not find significant differences when we compared the distribution of ATG2B rs3759601, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880 and ATG5 rs2245214 genotypes and the PDB clinical characteristic. Thus, our results suggest that autophagy would be involved in PDB onset but it is not imply in the clinical outcome.

PDB occurs as a consequence of an increase of bone resorption followed by an excessive bone formation. The main alteration resides in osteoclasts that increase in size, number and activity. Many osteoclasts have cytoplasmic inclusions which have been associated with a possible deregulation of autophagy [1]. It has been reported that decreased autophagy increased the risk to suffer PDB, so the cytoplasmic inclusions could correspond with protein aggregates that have not been degraded [1,7,19,20]. Our results show that being a carrier of G allele of the ATG16L1 rs2241880 and G allele of ATG5 rs2245214 polymorphisms is associated with increased risk of developing PDB in a Spanish cohort; whereas being a carrier of the T allele of ATG10 rs1864183 polymorphism decreased the risk of developing the disease. Additional studies in other series of patients will be necessary to validate our findings.

Acknowledgments

We thank Ms Nieves Mateos for technical help.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RUM JDPM RGS. Performed the experiments: RUM JGA LCG ICP JDPM RGS. Analyzed the data: RUM JDPM RGS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JDPM RGS. Wrote the paper: RUM JDPM RGS. Sample collection: JGA LCG ICP JDPM.

References

1. Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif Tissue Int*. 2012 Aug; 91(2): 97–113. doi: [10.1007/s00223-012-9599-0](https://doi.org/10.1007/s00223-012-9599-0) PMID: [22543925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543925/)
2. Roodman GD. Insights into the pathogenesis of Paget's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar; 1192:176–80. doi: [10.1111/j.1749-6632.2009.05214.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05214.x) PMID: [20392234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20392234/)
3. Corral-Gudino L, Borao-Cengotita-Bengoia M, Del Pino-Montes J, Ralston S. Epidemiology of Paget's disease of bone: a systematic review and meta-analysis of secular changes. *Bone*. 2013 Aug; 55(2): 347–52. doi: [10.1016/j.bone.2013.04.024](https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.04.024) PMID: [23643679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23643679/)
4. Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, et al. A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. *J Bone Miner Res*. 2000 Dec; 15(12):2315–29. PMID: [11127197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11127197/)
5. Sieradzan KA, Mehan AO, Jones L, Wanker EE, Nukina N, Mann DM. Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp Neurol*. 1999 Mar; 156(1):92–9. PMID: [10192780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10192780/)
6. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002 Jan; 160(1): 255–63. PMID: [11786419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11786419/)
7. Daroszewska A, van 't Hof RJ, Rojas JA, Layfield R, Landao-Basonga E, Rose L, et al. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSTM1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum Mol Genet*. 2011 Jul 15; 20(14):2734–44. doi: [10.1093/hmg/ddr172](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr172) PMID: [21515589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21515589/)
8. Bolland MJ, Tong PC, Naot D, Callon KE, Wattie DJ, Gamble GD, et al. Delayed development of Paget's disease in offspring inheriting SQSTM1 mutations. *J Bone Miner Res*. 2007 Mar; 22(3):411–5. PMID: [17181397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17181397/)
9. Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R. SQSTM1 mutations—Bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res*. 2014 Jul 1; 325(1):27–37. doi: [10.1016/j.yexcr.2014.01.020](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.020) PMID: [24486447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486447/)
10. Novack DV. Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res*. 2011 Jan; 21(1):169–82. doi: [10.1038/cr.2010.159](https://doi.org/10.1038/cr.2010.159) PMID: [21079651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21079651/)

11. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol.* 2010 Dec; 32(4):431–6. doi: [10.1007/s00281-010-0220-1](https://doi.org/10.1007/s00281-010-0220-1) PMID: [20814791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20814791/)
12. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem.* 2008 Aug 15; 283(33):22847–57. doi: [10.1074/jbc.M802182200](https://doi.org/10.1074/jbc.M802182200) PMID: [18524774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18524774/)
13. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Rep.* 2008 Sep; 9(9):859–64. doi: [10.1038/embor.2008.163](https://doi.org/10.1038/embor.2008.163) PMID: [18704115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18704115/)
14. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17; 282(33):24131–45. PMID: [17580304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17580304/)
15. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008 Jan 11; 132(1):27–42. doi: [10.1016/j.cell.2007.12.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018) PMID: [18191218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18191218/)
16. Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med.* 2012 Feb 29; 44(2):73–80. doi: [10.3858/emm.2012.44.2.029](https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.2.029) PMID: [22257882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22257882/)
17. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol.* 2012 Jan 10; 22(1):R29–34. doi: [10.1016/j.cub.2011.11.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.034) PMID: [22240478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22240478/)
18. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature.* 2010 Jul 1; 466(7302):68–76. doi: [10.1038/nature09204](https://doi.org/10.1038/nature09204) PMID: [20562859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20562859/)
19. Chamoux E, Couture J, Bisson M, Morissette J, Brown JP, Roux S. The p62 P392L mutation linked to Paget’s disease induces activation of human osteoclasts. *Mol Endocrinol.* 2009 Oct; 23(10):1668–80. doi: [10.1210/me.2009-0066](https://doi.org/10.1210/me.2009-0066) PMID: [19589897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589897/)
20. Collet C, Michou L, Audran M, Chasseigneaux S, Hilliquin P, Bardin T, et al. Paget’s disease of bone in the French population: novel SQSTM1 mutations, functional analysis, and genotype-phenotype correlations. *J Bone Miner Res.* 2007 Feb; 22(2):310–7. PMID: [17129171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17129171/)
21. Schleinitz D, Distefano JK, Kovacs P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan assay. *Methods Mol Biol.* 2011; 700:77–87. doi: [10.1007/978-1-61737-954-3_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3_6) PMID: [21204028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204028/)
22. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008 May; 19(5):2092–100. doi: [10.1091/mbc.E07-12-1257](https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1257) PMID: [18321988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321988/)
23. Cheng J-F, Ning Y-J, Zhang W, Lu Z-H, Lin L. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2010 Mar 14; 16(10):1258–66. PMID: [20222171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20222171/)
24. Lacher M, Schroepf S, Ballauff A, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R, et al. Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn’s disease in German children. *Acta Paediatr.* 2009 Nov; 98(11):1835–40. doi: [10.1111/j.1651-2227.2009.01438.x](https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01438.x) PMID: [19659808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19659808/)
25. Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R, et al. A Crohn’s disease variant in Atg16L1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature.* 2014 Feb 27; 506(7489):456–62. doi: [10.1038/nature13044](https://doi.org/10.1038/nature13044) PMID: [24553140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553140/)
26. Songane M, Kleinnijenhuis J, Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Parwati I, Oosting M, et al. Polymorphisms in Autophagy Genes and Susceptibility to Tuberculosis. *PLoS ONE.* 2012 Aug 6; 7(8):e41618. doi: [10.1371/journal.pone.0041618](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041618) PMID: [22879892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22879892/)
27. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009 Nov; 41(11):1228–33. doi: [10.1038/ng.468](https://doi.org/10.1038/ng.468) PMID: [19838195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19838195/)
28. Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol.* 2009 Aug; 3(4):366–75. doi: [10.1016/j.molonc.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007) PMID: [19559660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559660/)
29. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio J-M, Criollo A, Maiuri MC, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep; 1793(9):1524–32. doi: [10.1016/j.bbamcr.2009.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.006) PMID: [19371598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19371598/)
30. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone.* 2003 Jul; 33(1):28–37. PMID: [12919697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919697/)
31. Hsu Y-L, Hung J-Y, Ko Y-C, Hung C-H, Huang M-S, Kuo P-L. Phospholipase D signaling pathway is involved in lung cancer-derived IL-8 increased osteoclastogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Apr; 31(4):587–96. doi: [10.1093/carcin/bgq030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgq030) PMID: [20106902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20106902/)
32. Corral-Gudino L, del Pino-Montes J, García-Aparicio J, Alonso-Garrido M, González-Sarmiento R. Paget’s disease of bone is not associated with common polymorphisms in interleukin-6, interleukin-8

- and tumor necrosis factor alpha genes. *Cytokine*. 2010 Dec; 52(3):146–50. doi: [10.1016/j.cyto.2010.07.008](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.07.008) PMID: [20709566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20709566/)
33. Velikkakath AKG, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*. 2012 Mar; 23(5):896–909. doi: [10.1091/mbc.E11-09-0785](https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0785) PMID: [22219374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22219374/)

Genetic Testing and Molecular Biomarkers

Genetic Testing and Molecular Biomarkers: <http://mc.manuscriptcentral.com/genetic-testing>

VAV3 GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH PAGET DISEASE OF BONE

Journal:	<i>Genetic Testing and Molecular Biomarkers</i>
Manuscript ID	GTMB-2015-0292
Manuscript Type:	Original Articles
Date Submitted by the Author:	04-Dec-2015
Complete List of Authors:	<p>Usategui-Martín, Ricardo; Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC Calero-Paniagua, Ismael; Servicio de Reumatología. , Hospital Universitario de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC García-Aparicio, Judith; Servicio de Medicina Interna. , Hospital Universitario de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC Corral-Gudino, Luis; Servicio de Medicina Interna. , Hospital Universitario de Salamanca</p> <p>Del Pino-Montes, Javier; Servicio de Reumatología. , Hospital Universitario de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC</p> <p>González-Sarmiento, Rogelio; Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC; Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC). , Universidad de Salamanca-CSIC</p>
Keyword:	Genetic Testing, Human Genetics, Musculoskeletal, Polymerase Chain Reaction (PCR), Single nucleotide polymorphisms

SCHOLARONE™
Manuscripts

VAV3 GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH PAGET DISEASE OF BONE

Usategui-Martín R, MSc^{1,5}, Calero-Paniagua I, MD^{2,5}, García-Aparicio J, MD, PhD^{3,5}, Corral-Gudino L, MD, PhD³, Del Pino- Montes J, MD, PhD^{2,5}, González-Sarmiento R, MD, PhD^{1,4,5}

1. Unidad de Medicina Molecular-Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca
2. Servicio de Reumatología. Hospital Universitario de Salamanca
3. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario de Salamanca
4. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC). Universidad de Salamanca-CSIC
5. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Hospital Universitario de Salamanca-USAL-CSIC

Corresponding author:

Rogelio González Sarmiento
Unidad de Medicina Molecular-IBSAL
Facultad de Medicina
Campus Miguel Unamuno
37007 Salamanca
Phone: 34923294553
Fax: 342923294593
Email: gonzalez@usal.es

Co-Corresponding author

Javier del Pino Montes
Servicio de Reumatología
Hospital Universitario de Salamanca
Paseo de San Vicente
37007 Salamanca
Phone: 34923291100
Fax: 34923294593
Email: jpino@usal.es

Analysis of rs7528153 VAV3 gene polymorphism in Paget Disease of Bone.

Usategui

ABSTRACT

AIMS: Paget disease of bone (PDB) is a focal bone disorder affecting the skeleton segmentally. The main alteration resides in osteoclasts that increase in size, number and activity. One of the etiopathogenic hypotheses that try to explain the origin of the disease is the existence of genetic factors. It has been reported that the Rho GEF Vav3 is an essential factor in the regulation of osteoclast function and the alteration of VAV3 gene could influence the development of disease. The aim of our study was to characterize whether variations in VAV3 gene could modify the risk of suffering PDB.

PATIENTS AND METHODS: We have studied the genotypic and allelic distribution of the VAV3 c.892A>T / p.T298S (rs7528153) polymorphism in a Spanish cohort of 238 subjects with PDB and compared with 253 healthy subjects.

RESULTS: Our results indicated that individuals carrying the VAV3 rs7528153 TT genotype are associated with an increased risk of developing PDB ($p < 0,001$ OR (95% IC) = 3,15 (1,77-5,61))

CONCLUSIONS: These results suggest that VAV3 rs7528153 polymorphism could be a susceptibility factor of suffering PDB.

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

 Paget disease of bone (PDB) is a common disease characterized by focal areas of increased and disorganized bone turnover. Some patients are asymptomatic, whereas others develop complications such as pain, osteoarthritis, fracture, deformity, deafness, and nerve compression syndromes. A change occurs in the bone remodelling consisting in an increase in bone resorption followed by an excessive bone formation that results in a variegated and anarchic bone structure that alters the mechanical properties. The main alteration resides in osteoclasts, that increase in number and size and contain many more nuclei than normal (Ralston and Layfield, 2012)(Singer et al., 2006). The PDB is the most common metabolic bone disease after osteoporosis (Corral-Gudino et al., 2013). PDB is primarily caused by dysregulation of osteoclast differentiation and function. There is increasing evidence that this is due, in part, to genetic factors(Albagha et al., 2011, 2013; Ralston, 2008).

 Cell behaviour is partly controlled by Rho GTPases that regulate specific filamentous actin structures involved in cell migration, adhesion and morphogenesis by acting as binary switches cycling between an inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) conformational states (Schmidt and Hall, 2002). Rho GTPases activation is mediated by GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) stimulating the exchange of GDP for GTP (Bustelo, 2001; Turner and Billadeau, 2002). Vav proteins are the best-characterized family of mammalian Rho GEFs. There are three mammalian Vav proteins: Vav1, Vav2 and Vav3 (Turner and Billadeau, 2002). Several reports indicate that Vav proteins are activated by integrins in multiple hematopoietic cell types and

Usategui

1
2
3 might regulate Rho GTPases and the actin cytoskeleton in response to cell adhesion and
4
5 extension (Gakidis et al., 2004).
6
7
8

9
10 Osteoclasts are very mobile cells involved in bone resorption. They differentiate
11 from monocyte/macrophage lineage precursors in response to the ligation of RANKL
12 (Receptor Activation of NF- κ B Ligand) to RANK receptor and M-CSF receptor (c-
13 FMS) (Teitelbaum and Ross, 2003). Mature osteoclasts are characterized by the
14 presence of many podosomes, dynamic adhesive structures consisting of a F-actin
15 nucleus surrounded by α v β 3 integrin, and other cytoskeletal proteins (Lakkakorpi and
16 Väänänen, 1991; Teitelbaum and Ross, 2003). In starting bone resorption osteoclasts
17 polarize and are subjected to large morphological changes that involve the formation of
18 actin rings surrounding the area of resorption. One osteoclast performs several cycles of
19 bone resorption, so their ability to remodel skeleton is crucial for the correct function
20 (Destaing et al., 2003; Lakkakorpi and Väänänen, 1991). It has been reported that the
21 Rho GEF Vav3 is an essential factor in the regulation of osteoclast function, being
22 crucial in osteoclast polarization required for the initiation of the resorptive activity
23 (Faccio et al., 2005). There are several evidences that indicate that alterations in Vav3
24 cause alterations in bone metabolism. Vav3^{-/-} mice display increased bone mass and are
25 protected against bone loss (Faccio et al., 2005), features similar to those described in
26 PDB patients.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Thus, the aim of our study was to characterize whether variations in VAV3 gene
50 could modify the risk of developing PDB. We have studied VAV3 c.892A>T / p.T298S
51 (rs7528153) polymorphism to evaluate its putative role in the susceptibility of suffering
52
53
54
55
56 PDB.
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

2.1- Subjects

We have studied 238 patients diagnosed as suffering PDB. In cases of familial PDB we have included only one affected patient of each family. According to the prevalence of PDB, we calculated that a serie of 152 patients is representative of our PDB population. Patients were recruited in the Metabolic Bone Unit at the University Hospital of Salamanca between January 1990 and February 2014. As a control group, 253 sex-matched healthy subjects over 40 years old without previous history of PDB were recruited to the same hospital during the same period of time. From each patient we collected clinical variables such as gender, age of diagnosis, family history, number of affected bones, presence of fractures, skull involvement and cranial nerve involvement. All patients and control subjects gave informed consent to participate and the local ethics committee approved the study.

2.2- DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of patients and control subjects by standard phenol/chloroform procedure. Genotyping of VAV3 rs7528153 polymorphism was performed using TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assays (Applied Biosystems) that contain sequence-specific forward and reverse primers to amplify a fragment containing the polymorphic sequence and two probes labelled with VIC and FAM dyes to detect both alleles (c_447698_10) (Schleinitz et al., 2011). PCR reactions were carried out using TaqMan universal PCR Master Mix (Applied

Usategui

1
2
3 Biosystems) following manufacturer's instructions in a Step-One Plus Real-time PCR
4 system (Applied Biosystems). To assess reproducibility a randomly selected 5% of the
5 samples were re-genotyped and all of these genotypes matched with genotypes initially
6 designated.
7
8
9
10

11 12 13 14 2.3- Statistical analyses

15
16
17
18 Goodness of fit to Hardy-Weinberg equilibrium expectations was assessed by
19 chi-squared test for VAV3 rs7528153 polymorphism in control group. Odds ratios
20 (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated using unconditional
21 logistic regression models to evaluate the association with PDB risk. Homozygous for
22 the allele with greater frequency among controls was used as the reference genotype.
23 These statistical analyses were performed using SPSS 21 software. For the analysis,
24 differences with a p-value<0.05 were considered as statistically significant.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 RESULTS

37
38
39
40 A total of 238 PDB patients and 253 healthy subjects were analysed in the
41 present study. The clinical characteristics for each patient were summarized in table1.
42 The genotype distributions of VAV3 c.892A>T / p. T298S (rs7528153) polymorphism
43 in control samples were in Hardy-Weinberg equilibrium. We found statistically
44 significant differences in genotype distribution between PDB patients and controls.
45 Homozygous TT genotype of VAV3 c.892A>T / p. T298S (rs7528153) polymorphism
46 was associated with an increased risk of developing PDB. The study of recessive and
47 dominant codominance confirmed these results (table 2). We also found significant
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 differences in the allelic distribution, thus, being a carrier of allele T confers an
4
5 increased risk of developing PDB (table2).
6
7
8

9
10 **DISCUSSION:**
11

12
13
14 Paget's disease of bone occurs as a consequence of an increase of bone
15
16 resorption followed by an excessive bone formation. The main alteration resides in
17
18 osteoclasts that increase in size, number and activity (Ralston and Layfield, 2012;
19
20 Singer et al., 2006). It has been reported that the Rho GEF Vav3 is an essential factor in
21
22 the regulation of osteoclast function (Faccio et al., 2005). Vav3 is expressed in mature
23
24 osteoblasts and osteoclasts. It has been reported that Vav3^{-/-} mice showed an increase in
25
26 density and thickness of bone trabeculae (Faccio et al., 2005), which coincides with
27
28 the histology of pagetic bone (Ralston and Layfield, 2012). Increased bone density in
29
30 Vav3^{-/-} mice is due to a low bone resorption: bone formation predominates versus bone
31
32 resorption (Faccio et al., 2005). Low bone resorption is due to defective maturation of
33
34 osteoclasts and, furthermore it has been reported that Vav3 influences both the
35
36 maturation of osteoclasts and the development of the normal functions of mature
37
38 osteoclasts (Faccio et al., 2005).
39
40
41
42
43
44

45
46 Several genetic factors have been related with the PDB (Ralston and Layfield,
47
48 2012; Ralston, 2008) so we hypothesize that polymorphic mutations in VAV3 gene
49
50 could influence the development of the disease. VAV3 c.892A>T (rs7528153)
51
52 polymorphism leads to an aminoacid change Thr- Ser at codon 298 localized in the SH
53
54 domain of the Vav3 protein. Our results showed that carriers of the T allele as well as
55
56 carriers of homozygous TT genotype (Ser/Ser) of VAV3 c.892A>T (rs7528153)
57
58
59
60

Usategui

1
2
3 polymorphism are associated with an increased risk of developing PDB in a Spanish
4
5 cohort of patients.
6
7
8

9 The pagetic bone is characterized by an increase in density and a thickness of the
10 bone trabeculae. The balance resorption-bone formation is lost and it occurs an excess
11 bone resorption followed by an excessive bone formation that results in increased bone
12 density (Ralston and Layfield, 2012; Ralston, 2008). Vav3 is an essential factor in the
13 osteoclast polarization required for the initiation of the resorptive activity (Faccio et al.,
14 2005). Vav3 shuttles Rac-GDP to its activated GTP-associated state. Rac-GTP prompts
15 association of lysosome-derived secretory vesicles with microtubules and therefore the
16 resorptive activity of osteoclasts(Faccio et al., 2005). The exchange of GDP for GTP is
17 mediated by SH domain of Vav3 protein(Bustelo, 2001). The VAV3 c.892A>T
18 (rs7528153) polymorphism is localized in SH domain, therefore our hypothesis is that
19 carrying a serine at position 298 could increase the activation of Rac-GTP and bone
20 resorption. Further analyses are necessary to confirm this hypothesis.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 In conclusion, this study highlights for the first time that VAV3 rs 7528153
39 polymorphism is a genetic biomarker of high risk of suffering PDB, although additional
40 studies would be necessary to validate our findings”
41
42
43
44

45 **ACKNOWLEDGMENTS:**

46
47
48
49 We thank Ms Nieves Mateos for technical help and Dra Irene Rodriguez
50 Hernandez for the manuscript revision. This work was supported by ISC IIII-FEDER:
51 PI10/00219, PI13/01741 and GRS-FEDER: 185/A/07.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT:

No competing financial interests exist

REFERENCES

Albagha, O.M.E., Wani, S.E., Visconti, M.R., et al. (2011). Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* **43**, 685–689.

Albagha, O.M.E., Visconti, M.R., Alonso, N., et al. (2013). Common susceptibility alleles and SQSTM1 mutations predict disease extent and severity in a multinational study of patients with Paget's disease. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 2338–2346.

Bustelo (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. , Published Online: 02 October 2001; | doi:10.1038/sj.onc.1204780 20.

Corral-Gudino, L., Borao-Cengotita-Bengoia, M., Del Pino-Montes, J., et al. (2013). Epidemiology of Paget's disease of bone: a systematic review and meta-analysis of secular changes. *Bone* **55**, 347–352.

Destaing, O., Saltel, F., Géminard, J.-C., et al (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* **14**, 407–416.

Faccio, R., Teitelbaum, S.L., Fujikawa, K., et al. (2005). Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* **11**, 284–290.

Gakidis, M.A.M., Cullere, X., Olson, T., et al (2004). Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J. Cell Biol.* **166**, 273–282.

Lakkakorpi, P.T., and Väänänen, H.K. (1991). Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 817–826.

Ralston, S.H. (2008). Pathogenesis of Paget's disease of bone. *Bone* **43**, 819–825.

Ralston, S.H., and Layfield, R. (2012). Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* **91**, 97–113.

Schleinitz, D., Distefano, J.K., and Kovacs, P. (2011). Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. *Methods Mol. Biol.* **700**, 77–87.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587–1609.

Singer, F.R., Mills, B.G., Gruber, H.E., et al. (2006). Ultrastructure of bone cells in Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2**, P51–P54.

Teitelbaum, S.L., and Ross, F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 638–649.

Usategui

1
2
3 Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-
4 subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 476–486.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLES:

Table 1. Clinical characteristics of PDB patients.

PDB PATIENTS		
Gender	Man	132
	Woman	106
Age of diagnosis	Over 60 years	188
	Under 60 years	50
Family history	Sporadic	213
	Family	25
Number of affected bones	Fewer than three	177
	More than three	61
Presence of fractures	Yes	17
	No	221
Involvement of the skull	Yes	90
	No	148
Cranial nerve involvement	Yes	33
	No	205

Table 2. Distribution of the genotypic and allelic frequencies of the VAV3 c.892A>T (rs7528153) polymorphism in cases and controls.

	PDB Patients	Controls	OR (95% CI)	P-value
Genotype				
AA	95 (39,9%)	131 (51.8%)	1.00	
AT	95 (39,9%)	101 (39.9%)	1,29 (0,88-1,90)	0,186
TT	48 (20,2%)	21 (8.3%)	3,15 (1,77- 5,61)	<0,001
<hr/>				
AA+AT	190 (79,8%)	232 (91.7%)	1.00	
TT	48 (20,2%)	21 (8.3%)	2,79 (1,61-4,82)	<0,001
<hr/>				
AA	95 (39,9%)	131 (51.8%)	1.00	
AT+TT	143 (60,1%)	122 (48.2 %)	1,61 (1,13-2,31)	0,009
<hr/>				
Allele				
A	285 (59,9 %)	363 (71.7%)	1.00	
T	191 (40,1%)	143 (28.3%)	1,70 (1,30-2,22)	<0,001