

GENETICA DELL'OSTEOPOROSI

Silvia Carbonell Sala, Laura Masi, Alberto Falchetti, Francesca Marini,
Maria Luisa Brandi

Dipartimento di Medicina Interna Università degli Studi di Firenze - Firenze e DEGENE s. r. l

Indirizzo per corrispondenza: Prof.ssa Maria Luisa Brandi
Dipartimento di Medicina Interna - Università degli Studi di Firenze
Viale Pieraccini, 6 - 50139 Firenze
tel: +39 055 4296586; fax: +39 055 2337867; e-mail: m.brandi@dmi.unifi.it

ABSTRACT

Osteoporosis is a skeletal chronic multifactorial disease, characterised by abnormal low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue. This disorder, present in both sexes, related to environmental and genetic factors, is becoming a major public health problem in most developed Countries. It presents a polygenic pattern of inheritance that complicates identification of disease genes (cytokines, calciotropic hormones, sex hormones and their receptors, bone matrix proteins, genes involved on estrogenic metabolism...). It's possible to identify associations between allelic polymorphisms, in genes involved in bone remodelling, and disease phenotype in population-based studies and case-control studies; giving us promising data for an earlier identification of Osteoporosis susceptibility and fracture risk. Preventive therapy could be targeted to patients at greatest osteoporosis risk, before fractures have occurred. Genetic polymorphisms begin to be also used to predict drug response. New era of pharmacogenetics represents an interesting prospective to identify potentially individuals to receive customised treatments.

Key words: multifactorial disease, osteoporosis, candidate genes

RIASSUNTO

L'Osteoporosi è un disordine multifattoriale dello scheletro, caratterizzato da riduzione della massa ossea e deterioramento microarchitetturale dell'osso. Colpisce entrambi i sessi, e correla con fattori genetici ed ambientali. L'invecchiamento della popolazione, la rende uno dei maggiori problemi di salute pubblica nei paesi occidentali. Presenta ereditarietà poligenica complicando l'identificazione dei geni coinvolti nella malattia (citochine, ormoni calciotropici, ormoni sessuali e loro recettori, proteine della matrice ossea, geni del metabolismo estrogenico...). È possibile evidenziare eventuali associazioni tra polimorfismi allelici dei geni coinvolti nel rimodellamento osseo e fenotipo della patologia in studi di popolazione e studi caso-controllo, che forniscono dati per una precoce identificazione della suscettibilità all' Osteoporosi e al rischio di frattura. La prevenzione può essere così condotta sui pazienti ad alto rischio, prima che avvenga la frattura. I polimorfismi genetici cominciano ad essere utilizzati anche per predire la risposta ai farmaci. La nuova era della farmacogenetica rappresenta un'interessante prospettiva per identificare i potenziali soggetti adatti a ricevere trattamenti individuali.

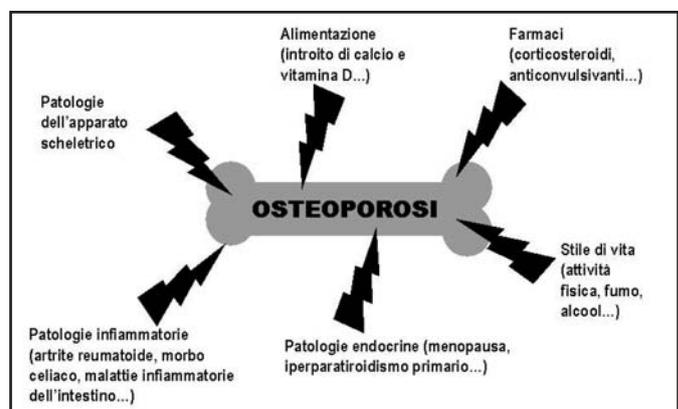
Parole chiave: Disordine multifattoriale, Osteoporosi, Geni candidati.

INTRODUZIONE

L'Osteoporosi è una patologia dello scheletro caratterizzata da riduzione della massa ossea e conseguente comparsa di fratture. Colpisce entrambi i sessi ed i diversi gruppi etnici. Sebbene, rimangano ancora aperte domande sulla sua ereditarietà, si tratta di una patologia complessa, mediata da fattori ambientali (figura 1) e diversi geni che influenzano la Densità Minerale Ossea (BMD) ed il rischio di frattura (1). I fattori di rischio genetici giocano un ruolo fondamentale, anche se soltanto in casi rari l'Osteoporosi può essere ereditata come semplice carattere Mendeliano, [Osteogenesis Imperfecta, Osteoporosi associata a mutazioni inattivanti il gene dell'aromatasi, del recettore estrogenico alfa (ERalfa) e della low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5 (LRP5)].

L'Osteoporosi senile risulta dall'interazione degli alleli polimorfici più comuni a tratti quantitativi (QTL) con fattori ambientali multipli, e

Figura 1. Fattori di rischio ambientale.



viene normalmente considerata una patologia poligenica. L'identificazione di geni di suscettibilità all'Osteoporosi (geni candidati) contribuirà, a lungo termine, a capire la biologia molecolare della variazione normale nella forza dell'osso aiutando notevolmente nella prevenzione delle fratture. La massa ossea presenta nei vari distretti scheletrici una larga variabilità all'interno della popolazione normale, questa variazione è incrementata dalle differenze di età, sesso ed etnia. Per predire il rischio di frattura, viene misurata la BMD tramite DXA, nei siti scheletrici a più alta incidenza di frattura quali collo del femore e vertebre lombari. Valori di BMD inferiori a $-2,5$ SD indicano Osteoporosi. Anche se la valutazione della BMD è soggetta ad imprecisioni dipendenti da fattori tecnici, è la metodica maggiormente utilizzata per la valutazione del fenotipo osteoporotico nella ricerca dei geni di suscettibilità. I polimorfismi più comuni probabilmente influenzano la normale variazione nella massa e struttura dell'osso, motivo per cui, la BMD e la presenza o meno di fratture sono i tratti rispettivamente quantitativi e qualitativi, utilizzati nella ricerca dei geni candidati. Diversi studi di associazione tra polimorfismi allelici e QTL evidenziano tra i possibili geni candidati quelli coinvolti nel rimodellamento osseo (Tabella I).

TABELLA I. Possibili geni coinvolti nel rimodellamento osseo e loro funzione

<u>Geni Candidati</u>	<u>Funzione</u>
Ormoni calciotropici, sessuali e i loro recettori:	
Recettore della Vitamina D (VDR)	Omeostasi del calcio e fosfato. Regolazione dell'attività osteoclastica ed osteoblastica.
Ormone Paratiroideo e Recettore ormone Paratiroideo (PTH e PTHR1)	Omeostasi del calcio. Regolazione dell'attività osteoclastica ed osteoblastica.
Recettori Estrogenici (ERalpha e ERbeta)	Controllo del rimodellamento osseo.
Calcitonina e Recettore Calcitonina (CT e CTR)	Funzione degli osteoclasti.
Gene Aromatasi (CYP19)	Codifica per l'Aromatasi, enzima che catalizza la conversione di androgeni in estrogeni.
Recettore Androgenico (AR)	Funzione degli osteoblasti.
Citochine , fattori di crescita e loro recettori:	
Citochine (Interleuchina-6)	Attività degli osteoclasti.
Gene Transforming growth factor beta-1 (TGFbeta-1)	Attività degli osteoblasti ed osteoclasti.
Gene Insulin-like Growth Factor (IGF-1)	Stimola la proliferazione e differenziazione dei condrociti.
Proteine di sintesi della matrice ossea:	
Geni del collagene (COL1A1 and COL1A2)	Codificano per il collagene, proteina che forma parte della matrice organica dell'osso.
Famiglia delle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (BMP-7 or OP-1)	Morfogenesi dell'osso, regolazione del calcio ed omeostasi dell'osso.
Altre:	
Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)	Regola la proliferazione degli osteoblasti e la formazione dell'osso
Sistema Receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG)	Regola la formazione, differenziazione ed attivazione degli osteoclasti.
Metilnetraidrofolato reductasi (MTHFR)	Coinvolta nella sintesi del collagene.
Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	Stimola la differenziazione e/o l'attività degli osteoclasti.

GENETICA DELL'OSTEOPOROSI

L'osteoporosi è una patologia cronica multifattoriale, alla cui patogenesi concorrono cioè vari fattori genetici ed ambientali. I fattori genetici sono rappresentati dal pool di geni che regolano l'espressione dei caratteri legati allo sviluppo della patologia (massa e microarchitettura

ossea). I fattori ambientali comprendono abitudini alimentari (introito di calcio e vitamina D), consumo di alcool, tabacco e caffè, attività fisica, assunzione di farmaci che interferiscono con il metabolismo fosfo-calcico ed esercitano soprattutto un effetto selettivo sulle caratteristiche genetiche dell'individuo. Infatti, nonostante siano evidenti diverse influenze ambientali su determinazione e mantenimento della BMD, studi su gemelli e famiglie osteoporotiche indicano che il contributo genetico alla patogenesi dell'osteoporosi è responsabile del 50-80% della variabilità interindividuale della BMD (2-6).

Diversi approcci genetici consentono di studiare e capire i disordini multifattoriali: analisi di linkage, allele sharing in sib pairs, studi dei geni candidati e incroci tra cavie di laboratorio (6). Differenze etniche nella BMD e nel turnover osseo evidenziano l'importanza dei fattori genetici nella patogenesi dell'osteoporosi. Le donne di colore hanno una BMD più alta ed una minore incidenza di Osteoporosi rispetto alle donne bianche a parità di età, peso, altezza, introito di calcio ed attività fisica. La popolazione caucasica e quella asiatica presentano inoltre un maggiore rischio di fratture. Queste variazioni di incidenza dell'osteoporosi tra le diverse etnie possono essere legate a fattori ambientali ma possono anche riflettere differenze genetiche ereditarie. Studi condotti su gruppi familiari hanno confermato l'esistenza di un contributo genetico alla patogenesi dell'osteoporosi, dimostrando una correlazione nella BMD tra madri e figlie in particolar modo a livello vertebrale (7, 8). Se confrontate con donne della stessa fascia d'età, le figlie di donne osteoporotiche hanno una ridotta BMD ed un incrementato rischio di frattura dopo la menopausa (7). Un contributo fondamentale per valutare l'influenza dei geni e dell'ambiente sulla variabilità fenotipica della BMD e sullo sviluppo dell'osteoporosi lo hanno fornito studi sui gemelli mono- e dizigoti. Mentre nei dizigoti le differenze nella BMD possono essere dovute sia a fattori genetici che ambientali, nei monoigoti le differenze nella BMD sono attribuibili esclusivamente a fattori ambientali. Questi studi hanno dimostrato un'alta concordanza nella BMD e nei valori di osteocalcina nei monoigoti rispetto ai dizigoti confermando fortemente la rilevante influenza genetica sul metabolismo osseo (2, 3, 7-10). Molto importanti sono anche gli studi volti alla ricerca di un'associazione tra fenotipo patologico e markers genetici polimorfici nei soggetti affetti e non affetti di una popolazione sottoposta ad analisi. Per l'osteoporosi le caratteristiche principali da valutare sono la bassa BMD e le fratture. In questi studi possiamo riscontrare un'associazione positiva nel caso che: l'allele studiato sia la causa della malattia, oppure l'allele non sia la causa diretta della malattia ma si trovi in linkage disequilibrium con la causa diretta, oppure l'apparente associazione sia dovuta ad un artefatto causato da un errato campionamento della popolazione in esame e/o quella di controllo (fattori confondenti). Alcuni approcci alternativi poco studiati possono essere gli studi di linkage (11, 12), transmission disequilibrium test nell'uomo (13, 14) o QTL mapping in cavie di laboratorio (15).

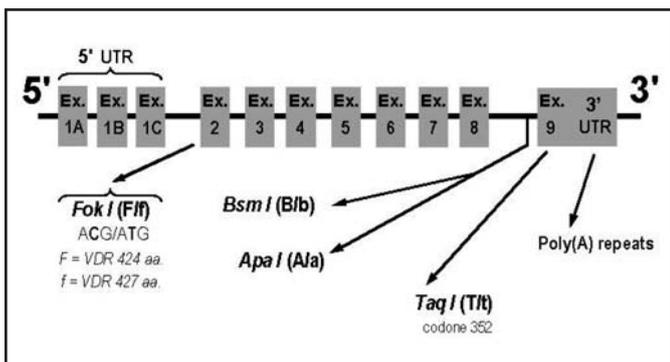
I Geni candidati dell'Osteoporosi

I principali geni candidati per gli studi di associazione sono quelli implicati nella regolazione del metabolismo osseo (tabella I). Diverse interazioni genetiche e/o ambientali possono portare allo stesso fenotipo osteoporotico; è anche possibile che alcuni individui avendo uno o più alleli per la predisposizione alla malattia, e quindi geneticamente a maggiore rischio per l'Osteoporosi, non diventino mai osteoporotici (penetranza incompleta) o al contrario, individui che non presentano alleli di predisposizione possano sviluppare osteoporosi senile causata da fattori non-genetici (fenocopia).

1. La Vitamina D e il suo recettore (VDR)

La Vitamina D promuove l'assorbimento intestinale e renale del calcio ed è indispensabile per lo sviluppo ed il mantenimento della massa ossea. Gli effetti della Vitamina D sono mediati dal suo recettore nucleare (VDR), che forma un complesso eterodimerico con il recettore dell'acido retinoico ed interagisce con i fattori di trascrizione. VDR (12q12-14) codifica per una proteina di 427 aminoacidi (aa), che regola il trasporto e l'omeostasi del calcio ed è stato proposto come il locus a maggior effetto genetico sulla BMD negli studi di associazione (Figura 2). Sono presenti diversi siti polimorfici nella regione 3' del

Figura 2. Polimorfismi del gene VDR (Ex.=Esone, UTR=Untranslated region)



gene umano VDR identificati dalle endonucleasi di restrizione TaqI, ApaI, BsmI e EcoRV ed un'altra variante polimorfica, riconosciuta da FokI, a livello del presunto codone di inizio della trascrizione nell'esone 2. Gli alleli vengono rispettivamente chiamati T-t, A-a, B-b, E-e e F-f: le lettere minuscole identificano la presenza del sito di restrizione e le lettere maiuscole indicano l'assenza di tale sito. In un campione di popolazione Australiana è stata evidenziata l'associazione tra le varianti alleliche BsmI di VDR e livelli nel siero di osteocalcina, marcatore del turnover osseo (16) ed anche un'associazione tra i polimorfismi in 3' e la diminuzione del valore della BMD in studi su coppie di gemelli e su donne in postmenopausa non imparentate tra loro. Studi condotti negli anni successivi hanno dato risultati contrastanti, derivanti forse da un'adeguata dimensione del campione, dalla presenza di fattori confondenti (introito di calcio), e dalle interazioni ambientali. Inoltre, non è possibile escludere completamente la presenza di un linkage disequilibrium tra polimorfismi di VDR e altri geni coinvolti nel metabolismo osseo. Infatti, altri studi mostrano l'effetto modulatore di ERalpha su VDR per la determinazione della BMD, suggerendo anche l'esistenza di una interazione gene-gene (17, 18). Per fare chiarezza, recentemente è stato realizzato uno studio di meta-analisi che combina 16 studi separati confermando l'associazione tra varianti alleliche di BsmI e variazione dei valori della BMD, sebbene l'analisi abbia mostrato un'associazione più debole di quella descritta in origine (19). Dato che i polimorfismi presenti nella regione 3' di VDR non codificano per aa diversi nella proteina come possiamo correlare queste varianti alleliche a differenze funzionali del recettore? Alcuni studi hanno mostrato che i polimorfismi prima descritti non influenzano l'abbondanza dell'mRNA (20). Il polimorfismo FokI (21), genera una proteina con lunghezza diversa: il genotipo FF (forma corta) provoca un aumento dell'attivazione della trascrizione (22). Il genotipo ff è stato associato ad una bassa BMD lombare in donne Ispano-Americane in età postmenopausale, Giapponesi, Nordamericane e Italiane, ma non in donne Francesi e Svizzere (21-26). Questi dati contrastanti possono derivare da differen-

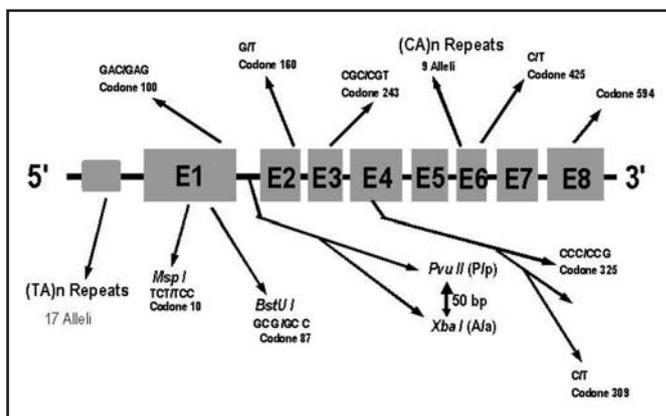
ze etniche e di età tra i diversi gruppi studiati. Anche i fattori ambientali, come l'assunzione di calcio giornaliero, possono modulare gli effetti dei genotipi di FokI sulla BMD. I risultati ottenuti da tutti questi studi di associazione mostrano come i polimorfismi di VDR da soli non siano marcatori genetici utili per assegnare il rischio di Osteoporosi, sebbene risultino molto utili per spiegare la variabilità della BMD osservata nella popolazione. Per questo è stato eseguito uno studio di meta-analisi con i dati ottenuti sui polimorfismi di VDR con l'obiettivo di stimare le frequenze alplotipiche, determinare il linkage disequilibrium e stimare il grado di associazione tra alplotipi e osteoporosi/BMD (27). Dai risultati emerge che l'aplotipo più comune, nonostante la provenienza etnica, è baT, seguito da BAa e baT nella popolazione caucasica, e baT e BaT in quelle asiatiche, indicando un forte linkage disequilibrium tra i polimorfismi BsmI e TaqI. Queste osservazioni dimostrano l'importanza dell'utilizzo degli alplotipi piuttosto che dei singoli polimorfismi. Anche in questo caso, non è stata trovata una correlazione significativa tra osteoporosi e i polimorfismi di VDR, ma emerge il dato di rilevante associazione tra gli alplotipi Ba e BAa.

2. Estrogeni e Recettori degli Estrogeni

Gli estrogeni sono indispensabili per l'acquisizione del picco di massa ossea in entrambi i sessi e per il suo mantenimento negli adulti. Condizioni patologiche associate ad un deficit prematuro degli estrogeni accelerano la perdita della massa ossea. Il deficit estrogenico è la causa principale d'Osteoporosi postmenopausale e gioca un ruolo importante anche nell'Osteoporosi senile, causando in entrambi i casi una maggiore incidenza di fratture dovute alla fragilità delle ossa. Le due isoforme del recettore estrogenico (ER-beta e ER-alpha) sono codificate da due geni diversi con distribuzione tessuto specifica e hanno capacità diverse nel legare il ligando (estrogeni ed antiestrogeni) e nell'attivazione della trascrizione dei geni bersaglio. Diverse osservazioni mostrano il coinvolgimento di questi recettori nella determinazione della BMD in entrambi i sessi. Un paziente maschio portatore di fenotipo osteoporotico è stato associato a una mutazione in omozigosi inattivante ER-alpha (28). Anche studi eseguiti su topi knockout mostrano come i topi knockout per ER-alpha presentino una BMD più bassa di quella dei topi knockout per ER-beta, sostenendo l'ipotesi che ER-alpha sia un indicatore migliore del rischio osteoporotico. È accettabile pensare che le varianti alleliche più comuni di ER-alpha, presenti nella popolazione, possano causare risposte interindividuali diverse agli estrogeni.

Nel gene ER-alpha (6q25) sono stati descritti diversi polimorfismi, ma tutti gli studi di associazione si focalizzano su 3 di essi (Figura 3): due

Figura 3. Polimorfismi del gene ER-alpha



nell'introne 1 (riconosciuti da PvuII e XbaI e chiamati rispettivamente P-p e X-x, in base alla presenza o assenza del sito di restrizione) e un terzo nel promotore (polimorfismo a numero variabile di ripetizioni TA). Questi tre polimorfismi sono stati associati alla BMD nelle donne Giapponesi (29, 30): l'aplotipo Px in omozigosi e 12 ripetizioni TA mostrano un maggiore rischio di Osteoporosi e una BMD più bassa. Tuttavia, studi simili su altre popolazioni hanno mostrato risultati contrastanti (17, 31, 32). Uno studio su grossa coorte di donne italiane in postmenopausa (33), ha mostrato un forte linkage disequilibrium tra i due polimorfismi intronici: elevata frequenza degli aplotipi PX e px nella popolazione Caucasica, mentre l'aplotipo Px risulta molto raro. Nella popolazione Caucasica è l'aplotipo px, mentre in quella Asiatica quello Px, a correlare con l'aumentato rischio di Osteoporosi. Le differenze etniche possono spiegare solo in parte questa diversità e non possiamo escludere la modulazione di ER-alpha da parte di varianti alleliche presenti in altri geni. Inoltre, è stato riscontrato un forte linkage tra l'aplotipo px ed il basso numero di ripetizioni (TA)_n ed un'elevata correlazione tra basso numero di ripetizioni (TA<15) e valori più bassi di BMD/alta incidenza di fratture vertebrali. Questa associazione è confermata anche da due studi su popolazioni Americana e Danese (34, 35), ma non da uno studio su popolazione Scozzese che sembra associare un alto numero di ripetizioni (almeno TA=26) con bassi valori di BMD a livello delle vertebre lombari (36). Il meccanismo molecolare coinvolto nella variazione della BMD in base al numero di ripetizioni non è ancora chiaro, ma la localizzazione di questo polimorfismo nella zona tra i promotori A e B di ER-alpha lascia ipotizzare che il numero diverso di ripetizioni TA abbia effetti fisiologici sul promotore e sulla trascrizione del mRNA. Per sopperire ai problemi generati da campionamenti inadeguati, è stato eseguito un lavoro di meta-analisi, pubblicato recentemente (37) dal gruppo GENOMOS (Genetic Markers for Osteoporosis), che ha raggruppato e analizzato i tre polimorfismi di ER-alpha su un'ampia casistica (18.917 individui). Da questo studio emerge che non esiste correlazione statisticamente significativa tra i polimorfismi di ER-alpha e la BMD. Per contro, è stata trovata un'associazione tra il polimorfismo XbaI e il rischio di frattura. XbaI sembrerebbe determinare il rischio di frattura attraverso un meccanismo BMD-indipendente.

Un'ulteriore e promettente applicazione dello studio di tali polimorfismi potrà derivare dalle loro implicazioni farmacogenetiche e dalla possibilità quindi di fornire una migliore strategia terapeutica. Tuttavia, con i dati a disposizione non possono essere formulate terapie farmacologiche derivanti da screening di tipo farmacogenomico.

3. Geni del Collagene

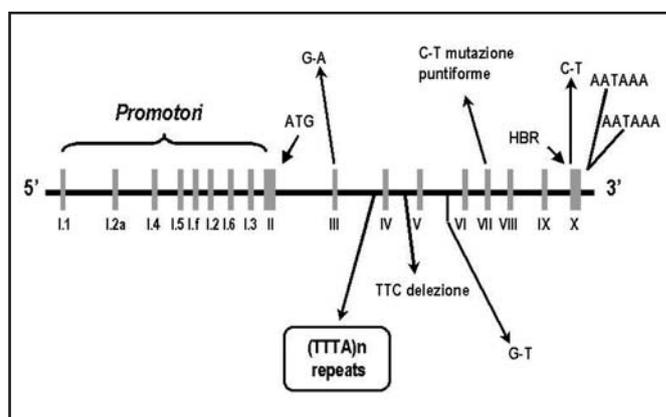
Il collagene di tipo I è il maggiore componente organico (90%) della matrice ossea. I geni codificanti il procollagene di tipo I sono il gene COLIA-1 (17q21.3-q22.1) e COLIA-2 (7q22.1). A causa dell'importanza di questa proteina, entrambi i geni codificanti sono stati considerati geni candidati per la determinazione della massa ossea. Uno studio realizzato su donne inglesi in postmenopausa ha mostrato l'associazione del polimorfismo G/T localizzato nell'introne 1 di COLIA-1 con la BMD e il rischio di frattura (38). Studi successivi utilizzando campionamenti maggiori ed eseguiti su popolazioni diverse sembrano confermare questo dato (39, 40). Il meccanismo molecolare che causa l'associazione tra polimorfismo e BMD non è ancora chiaro. L'allele sfavorevole (variante T, arbitrariamente chiamato allele "s") modifica il sito di riconoscimento del dominio di legame del fattore di trascrizione Sp1, forse modulando la trascrizione di tale gene. Tali studi evidenziano la mancanza di associazione tra gli alleli Sp1 e la BMD mentre associano tale polimorfismo con le fratture vertebrali, suggerendo un effetto del

polimorfismo sulla "qualità" dell'osso non associato direttamente con la BMD. Per chiarire l'associazione tra il polimorfismo Sp1 e BMD/fratture osteoporotiche è stata effettuata una meta-analisi di 26 studi indipendenti per un totale di 7849 individui (41). Questo studio ha evidenziato un'associazione significativa tra il genotipo "Ss" e valori bassi di BMD; e tra genotipo "ss" e valori bassi di BMD a livello lombare. Nel caso delle fratture osteoporotiche è stato riscontrato un aumento del rischio di fratture vertebrali per entrambi i genotipi "Ss" e "ss", mentre il rischio di fratture non vertebrali non è correlato al genotipo COLIA-1 (bisogna ricordare che sono presenti pochi studi sulle fratture non vertebrali). Concludendo, possiamo dire che il polimorfismo Sp1 è dunque associato alla variazione della BMD ed al rischio di fratture, in particolare quelle vertebrali. Inoltre, esistono differenze etniche nella distribuzione del polimorfismo Sp1, che risulta molto comune nelle popolazioni Caucasiche, meno comune in quelle Africane e raro in quelle Asiatiche (42). Tutt'oggi non è ancora chiaro il meccanismo che porta alla rapida demineralizzazione nei portatori dell'allele "s". Studi eseguiti su osteoblasti con genotipo opposto mostrano un aumento dell'affinità di legame dell'allele "s" per la proteina Sp1, portando ad una maggiore abbondanza di trascritti primari di RNA di quelli ottenuti dall'allele "S" negli eterozigoti "Ss". Il collagene prodotto dagli individui "Ss" presenta una proporzione maggiore di messaggero di COLIA-1 rispetto a COLIA-2. Infine, è stato osservato che la resistenza dell'osso derivato dagli individui "Ss" è minore rispetto a quella ottenuta dall'osso derivato da individui "SS". Quindi il polimorfismo Sp1 può essere ritenuto una variante funzionale che predispone all'osteoporosi attraverso meccanismi che portano a cambiamenti nella massa ossea e nella qualità dell'osso (43).

4. Gene per l'Aromatasi (CYP19)

Il complesso dell'aromatasi-citocromo P450 catalizza la conversione degli androgeni ad estrogeni. L'espressione dell'mRNA e l'attività enzimatica dell'aromatasi sono state entrambe dimostrate in colture di osteoblasti umani, suggerendo che gli estrogeni siano prodotti localmente nell'osso. L'aromatasi è codificata da CYP19 (15q21.1) (Figura 4) e l'espressione tessuto-specifica di isoforme diverse è dovuta all'uso di promotori diversi ed a splicing alternativi. Mutazioni inattivanti CYP19 sono associate, in entrambi i sessi, con un aumentato turnover osseo e con un decremento della BMD. Sono noti vari polimorfismi di CYP19 coinvolti nella regolazione dell'attività dell'aromatasi attraverso la stabilizzazione dell'mRNA, l'aumento della trascrizione o la regolazione post-traduzionale dell'espressione. Tra questi vi è un polimorfismo C>T (regione 3' non tradotta) e uno rappresentato

Figura 4. Gene umano CYP 19 (15q21.2) e localizzazione del polimorfismo (TTTA)_n



dalla ripetizione del tetranucleotide (TTTA)_n (introne 4). Tuttavia, i dati sull'effetto di tali polimorfismi sull'osso sono ancora piuttosto scarsi. Uno studio su donne italiane in postmenopausa ha evidenziato che l'allele (TTTA)₁₂ è il più comune nelle donne non osteoporotiche, suggerendo una sua possibile azione protettiva (44). Inoltre, le donne con un più alto numero di ripetizioni (TTTA) >11 mostrano una BMD lombare più alta delle donne con un basso numero di ripetizioni, (TTTA)₈₋₁₁. Dati confermati anche per individui di sesso maschile. Inoltre, fibroblasti in vitro di soggetti con fenotipo ad alto numero di TTTA mostrano una attività aromatasica più elevata rispetto alle cellule di soggetti con genotipo opposto (45).

5. Gene per Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)

IGF-I è un fattore di crescita coinvolto nella determinazione della massa ossea che stimola la proliferazione e differenziazione dei condrociti. È inoltre, un controllore importantissimo dei componenti minerali essenziali dell'osso (calcio e fosfato). IGF-I esercita un effetto sulla BMD durante la fase di crescita ed in età adulta, aumentando la sintesi di collagene di tipo I e osteocalcina, stimolando l'attività della fosfatasi alcalina, determinando una proliferazione e differenziazione degli osteoblasti. L'allele (CA)₁₉₂ in omozigosi del polimorfismo microsatellitare (CA)_n repeat (regione del promotore) è risultato associato a bassi livelli serici di IGF-I in uomini con osteoporosi idiomatica e a bassi livelli serici di IGF-I in ragazzi e ragazze in età prepuberale (46). Tuttavia, malgrado il chiaro ruolo di questo ormone nello sviluppo e mantenimento del picco di massa ossea, tali dati non sono stati confermati in donne giapponesi in postmenopausa (47), adolescenti caucasici (maschi e femmine) (48), e giovani maschi adulti (49). Quindi, tale polimorfismo richiede ulteriori studi per valutare se possa essere considerato un marcatore di suscettibilità per il rischio di osteoporosi.

6. Gene per Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5 (LRP5)

LRP5 (11q12-13) codifica per una proteina transmembrana, appartenente alla famiglia dei recettori per le LDL, che regola la proliferazione degli osteoblasti e la formazione dell'osso. Topi knockout per LRP5 mostrano un deficit nella formazione dell'osso e sono soggetti a fratture spontanee (50). LRP5 è un importante modulatore genetico della BMD: mutazioni su LRP5 comportano una perdita di funzionalità del gene, causando Osteoporosi-pseudoglioma (51) caratterizzata da bassa BMD, fratture spontanee e cecità; viceversa mutazioni implicanti un aumento della funzionalità del gene causano una sindrome autosomica dominante caratterizzata da elevata massa ossea. Si conosce ancora poco l'influenza delle variante alleliche di tale gene sul fenotipo osseo. Recentemente, studi di associazione hanno mostrato una correlazione significativa tra i polimorfismi di questo gene (V667M, A1330V e C171346A) e la BMD (52-54). Al momento non è chiaro se questi polimorfismi possano alterare la funzionalità e/o l'espressione della proteina LRP5. Saranno necessari test in vitro per valutare la valenza di tali polimorfismi sul funzionamento di LRP5 o per scoprire se si trovano in linkage disequilibrium con altre varianti alleliche ad effetto regolatorio. Uno studio condotto su popolazione Caucasica ha mostrato una significativa associazione tra polimorfismo V667M, contenuto minerale osseo (BMC) a livello della spina lombare e statura (55). I portatori dell'allele A presentano un basso BMC. Nei maschi adulti tale polimorfismo è responsabile di circa il 15% della variabilità fenotipica; quindi alcuni fattori sesso-specifici o alcune varianti all'eliche sui cromosomi X ed Y potrebbero direttamente od indirettamente influenzare l'azione di LRP5 sul fenotipo osseo. Più recentemente è stata evidenziata una correlazione positiva di questo polimorfismo con

la BMD e con il BMC in una popolazione di individui caucasici (56). Sempre nella stessa popolazione, la variante allelica T di A1330V è risultata essere associata a: aumento del rischio di sviluppare osteoporosi negli uomini; guadagno di due anni nel raggiungimento del BMC vertebrale del peso e della statura nei giovani ancora in crescita. Un altro studio su pazienti britannici ha mostrato una significativa associazione tra polimorfismo C171346A e BMD lombare (52), che è risultata essere ancora maggiore analizzando solo i soggetti di sesso maschile. Perciò le varianti alleliche di LRP5 contribuiscono sostanzialmente alla determinazione della massa ossea, della statura ed influenzano l'accrescimento osseo, giocando un ruolo chiave nella determinazione del picco di massa ossea nelle popolazioni Caucasiche, candidando LRP5 come un importante gene di suscettibilità per l'Osteoporosi soprattutto per gli uomini.

7. Altri geni candidati

Studi isolati eseguiti su diversi polimorfismi presenti in altri geni candidati sono stati associati alla BMD o al rischio di frattura: Calcitonina (57) Interleuchina-6 (58), Transforming Growth Factor-beta (59), Androgen Receptor (34), Osteoprotegerin (OPG) (60, 61), Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) (62), Metilnitetraidrofolato Reduttasi (MTHFR) (63). Questi risultati hanno comunque bisogno di ulteriori conferme.

TERAPIA DELLO SHOCK

La genetica comparativa risulta molto utile per individuare i geni coinvolti nella predisposizione all'osteoporosi. L'utilizzo di cavie di laboratorio permette strategie di riproduzione che non possono essere eseguite negli esseri umani, e ci fornisce i fenotipi per misurare la resistenza dell'osso. Roditori e primati sono i modelli animali maggiormente utilizzati per l'identificazione dei geni coinvolti nell'osteoporosi (64-66); il topo è quello più utilizzato in assoluto. Gli animali knockout aiutano a mappare geni correlati all'osteoporosi ancora sconosciuti, favorendone la localizzazione cromosomica, lo studio di associazione dei loro polimorfismi con il rischio osteoporotico e lo studio della loro funzione. I ratti ovariectomizzati (OVX) sono i modelli più impiegati negli studi di fisiopatologia, diagnosi e trattamento dell'osteoporosi (67). L'ovariectomia mima lo stato di menopausa ed induce sviluppo di Osteoporosi sistemica dello scheletro periferico e assiale. Purtroppo, gli animali OVX, non presentano associazione con il basso introito di calcio della dieta o con la somministrazione di corticosteroidi (68, 69). Studi recenti dimostrano che anche la pecora è un modello molto promettente per gli studi delle patologie scheletriche, appropriato anche per i nuovi approcci che si propongono di valutare i biomateriali (68, 69). Anche i modelli cellulari si sono dimostrati molto utili per studiare la risposta ai vari biomateriali e il confronto tra condizioni patologiche e sane (70), fornendo interessanti prospettive future per studiare l'osteoporosi, la diagnosi e la terapia.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Le ultime decadi sono risultate importanti per la comprensione della complessità della genetica dell'Osteoporosi. La conoscenza delle principali vie genetiche coinvolte nella malattia, dei geni con varianti alleliche che possono ridurre od incrementare il rischio osteoporotico, hanno contribuito a chiarire la situazione. Questa malattia colpisce centinaia di milioni di persone in tutto il mondo per cui bisogna sforzarsi per conoscere le sue cause genetiche e preparare strategie preventive e trattamenti appropriati. Nuove aree della ricerca, come la

farmacogenetica, al momento ancora poco utilizzate per i disordini osteoarticolari, potranno risultare vantaggiose per migliorare i trattamenti farmacologici e la qualità di vita degli individui affetti. Infatti, le donne sane in premenopausa mostrano una risposta diversa al calcitriolo in accordo con genotipi specifici del gene VDR e l'importanza della risposta estrogenica varia secondo i diversi polimorfismi dei geni ER α e CYP19 (71). Promettenti applicazioni di alcuni di questi polimorfismi arrivano dalla farmacogenomica, come è il caso dell'utilizzo della terapia ormonale sostitutiva (TOS). Studi preliminari sull'influenza dei polimorfismi di ER-alpha ed Aromatasi sulla risposta della BMD in soggetti in menopausa in corso di TOS hanno evidenziato la mancanza di correlazione tra BMD rachide lombare e l'impiego di tale terapia. Soggetti con genotipo xx e pp presentano ridotta risposta alla TOS rispetto a quelli di genotipo opposto, mentre

rispondono in maniera significativa i soggetti con genotipo ad alto numero rispetto al genotipo a basso numero di TTTA (72). Comunque, saranno necessari studi di meta-analisi su grandi popolazioni che tengano conto dei vari fattori confondenti. L'approccio meta-analitico può apportare dati utili combinando sistematicamente risultati ottenuti da vari studi individuali, aumentando così la probabilità di evidenziare associazioni, aumentando l'accuratezza dei risultati e chiarendo le possibili cause delle differenze riscontrate tra singoli studi. Infine, la genetica comparativa potrà sicuramente aiutare a capire le varianti funzionali rispetto ad uno specifico background genetico, in modo da creare nuove strategie di prevenzione e trattamento, e di sviluppare nuovi modelli di biomateriali per la terapia dell'osteoporosi.

BIBLIOGRAFIA

1. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, et al. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in health families. *J Bone Miner Res* 1995; 10:2017-22
2. Smith DM, Nance WE, Kang KW, et al. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 1973; 52:2800-08
3. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 1987; 80:706-10
4. Mundy GR. Osteoporosis. *Boning up on genes. Nature* 1994; 367:216-7
5. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, et al. Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:808-13
6. Steward TL, Rakston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *Journal of Endocrinology* 2000; 166:235-45
7. Seeman E, Hopper JL, Bach LA, et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989; 320:554-8
8. Hansen MA, Hassager C, Jensen SB, et al. Is heritability a risk factor for postmenopausal osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 7:1037-43
9. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, et al. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989; 44:429-33
10. Harris M, Nguyen TV, Howard GM, et al. Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone* 1998; 22:141-45
11. Niu T, Chen C, Cordel H, et al. A genome-wide scan for loci linked to forearm bone mineral density. *Hum Genet* 1999; 104:226-33
12. Koller DL, Econs MJ, Rodríguez LA, et al. Genome scan for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3116-20
13. Deng HW, Shen H, Xu FH, et al. Test of linkage and association of vitamin D receptor gene, osteocalcin gene, and parathyroid hormone gene to bone mineral density in Caucasian pedigrees. *J Bone Miner Res* 2001; 17:678-786
14. Keen RW, Snieder H, Molloy H, et al. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor b1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins. *Rheumatology* 2001; 40:48-54
15. Beamer WG, Shultz KL, Donahue LR, et al. Quantitative trait loci for femoral and lumbar vertebral bone mineral density in C57BL/6J and C3T/HeJ inbred strains of mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1195-1206
16. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, et al. Contribution of trans-acting factors alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992; 89:6665-69
17. Gennari L, Becherini L, Masi L, et al. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution on bone mineral density. *J. Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:939-44
18. Willing M, Sowers M, Aron D, et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 1998; 13:695-705
19. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1841-49
20. Mocharlar H, Butch AW, Pappas AA, et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *J Bone Miner Res* 1997; 12:726-33
21. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1850-55

22. Arai H, Myamoto K, Taketani Y et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997; 12:915-21
23. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1043-48
24. Gennari L, Becherini L, Mansani R, et al. Fok I polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1379-86
25. Eccleshall TR, Garnero P, Gross C, et al. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in pre-menopausal French women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; 13, 31-35
26. Ferrari SL, Rizzoli R, Manen D, et al. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (Fok I) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res* 1998; 13:925-30
27. Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2004; 15:9-34
28. Smith EB, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N.Engl J Med* 1994; 331:1056-61
29. Sano M, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217:378-83
30. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11:306-11
31. Han KO, Moon IG, Kang YS, et al. Non association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:991-95
32. Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard AM, et al. No major effect of estrogen receptor polymorphisms on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone* 2000; 26:111-6
33. Becherini L, Gennari L, Masi L, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2043-50
34. Sowers M, Willing M, Burns T, et al. Genetic markers, bone mineral density and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1411-19
35. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, et al. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res* 2000; 15:2222-30
36. Albagha OM, McGuigan FE, Reid DM, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner Res* 2001; 16:128-34
37. Ioannidis JPA, Ralston SH, Bennett ST, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporotic outcomes. *JAMA* 2004; 292:2105-14
38. Grant SFA, Reid DM, Blake G, et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with polymorphic SP1 site in the collagen type I alpha 1 gene. *NatGenet* 1996; 14:203-05
39. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, et al. Relation of alleles of the collagen type Ia1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; 338:1016-21
40. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA et al. An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in men and women. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1384-9
41. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003; 32:711-7
42. Beavan S, Prentice A, Dibba B, et al. Polymorphism of the collagen type I alpha1 gene and ethnic differences in hip-fracture rates. *N Engl J Med* 1998; 339:351-2
43. Mann V, Hobson EE, Li B, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001; 107:899-907
44. Masi L, Becherini L, Gennari L, et al. Polymorphism of the Aromatase Gene in Postmenopausal Italian Women: Distribution and Correlation with Bone Mass and Fracture Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 80:3689-98
45. Gennari L, Masi L, Merlotti D, et al. A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2803-10
46. Gilsanz V, Rogers J, Bilezikian JP, et al. A simple sequence repeat in the IGF-I gene and its relationship to serum IGF-I and peak bone mass in pupertal boys and girls. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Endocrine Society*. 1999; Abstract no. OR23-2
47. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, et al. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density. *Calcified Tissue International* 1998; 63:306-11
48. Berg JP, Lehmann EH, Stakkestad JA, et al. IGF-I gene microsatellite polymorphisms and serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein 3 and bone mineral density in young individuals. *Proceedings of the Annual Meeting of the Endocrine Society* 2000; Abstract no. 1743
49. Rizzoli R, Ferrari S, Rosen C, et al. IGF-I gene 5 polymorphism influences serum IGF-I levels in relation to dietary calcium intake in healthy young males. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15(Suppl 1):S364
50. Kato M, Patel MS, Lévassieur R, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent

- embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a *Wnt* coreceptor. *J Cell Biol* 2002; 157:303-14
51. Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; 107:513-23
 52. Koay MA, Woon PY, Zhang Y, et al. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. *Bone Miner Res* 2004; 19:1619-27
 53. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 2004; 22:341-5
 54. Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, et al. LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density. *J Hum Genet* 2004; 49:80-6
 55. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet* 2004; 74:866-75
 56. Choudhury U, de Vernejoul M, Deutsch S, et al. Genetic variation in LDL receptor-related protein 5 (LRP5) is a major risk factor for male osteoporosis: results from cross-sectional, longitudinal and case-control studies. *J Bone Miner Res* 2003; S69
 57. Masi L, Becherini L, Colli E, et al. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 248:190-5
 58. Murray RE, McGuigan F, Grant SFA, et al. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 1997; 21:89-92
 59. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, et al. A sequence variation: 713-delC in the transforming growth factor-beta gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997; 20:289-94
 60. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1245-55
 61. Brandstrom H, Gerdhem P, Stiger F, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int* 2004; 74:18-24
 62. Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol* 2003; 1:E69
 63. Villadsen MM, Bunger MH, Carstens M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporos Int*; Published online: 6 August 2004
 64. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, et al. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 1996; 18:397-403
 65. Turner CH, Roeder RK, Wiczorek A, et al. Variability in skeletal mass, structure, and biomechanical properties between inbred strains of rats. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1532-9
 66. VandeBerg JL, Williams-Blangero S. Advantages and limitations of non human primates as animal models in genetic research on complex disease. *J Med Primatol* 1997;26:113-9
 67. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:175-92
 68. Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: a pilot study about different induction regimens. *J Orthop Trauma* 2000; 14:559-65
 69. Fini M, Pierini G, Giavaresi G, et al. The ovariectomized sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies *Int J Artif Organs* 2000; 23:275-81
 70. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:487-93
 71. Falchetti, A. Genetics of osteoarticular disorders, Florence, Italy, 22-23 February 2002. *Arthritis Res* 2002; 4:326-31
 72. Masi L, Ottanelli S, Del Monte F, et al. "Estrogen Receptor Alpha and Aromatase gene polymorphisms: response in bone mineral density to HRT in Post-Menopausal women. IOF World Congress on Osteoporosis, Rio de Janeiro, Brazil, May 14-18 2004

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato eseguito grazie ai finanziamenti a ML Brandi: MIUR 2003 "Genetics Markers of osteoporosis in Italian population"; progetto europeo "GENOMOS - Genetic markers for osteoporosis" (QLRT-2001-02629); FIRB PNR 2001-2003 (protocol RBNE01C5S2) "Identification of genetic susceptibility to multifactorial diseases in the Italian population"; progetto dell'ISS 2003 SARA n. 4AF1F10 "Correlation study between endocrine estrogenic activity and genetic polymorphisms" e con il supporto dell'ente cassa di risparmio di Firenze.