

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**MARCADORES DE METABOLISMO  
ÓSEO EN MUJERES CON  
OSTEOPOROSIS  
POSTMENOPAUSICA TRATADAS  
CON ALENDRONATO**

**Rebeca Reyes García  
Granada, 2007**





El trabajo de investigación que se expone en esta Memoria Doctoral ha sido realizado en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario San Cecilio, Granada, bajo la dirección de los doctores D. Manuel E Muñoz Torres y D. Pedro Mezquita Raya.

DIRECTORES:

D. Manuel E Muñoz Torres

D. Pedro Mezquita Raya



*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS.

Mi más sincero agradecimiento a:

Trinidad Guardia Archilla, por su capacidad de trabajo y trato con los pacientes.

Al personal auxiliar del Servicio de Endocrinología por su apoyo moral y su buen humor.

A las pacientes que han participado en este estudio, por su cariño y paciencia.

Al personal del laboratorio de la Facultad de Medicina, y muy especialmente a Magdalena Quintana y Rosario Arcas por su trabajo desinteresado y por los innumerables ratos compartidos.

A la Fundación Hospital Clínico por la ayuda económica prestada para la lectura de esta tesis.

Al doctor Diego Fernández García, por su contribución a mi formación científica. A Rafa, por su amistad y su apoyo en tiempos difíciles. A la Dra. Arántzazu Sebastián Ochoa, con la que comparto una gran amistad y una visión y actitud ante la vida.

Al doctor Pedro Mezquita Raya, por su ayuda técnica y científica y por sus enseñanzas.



# **Índice y Abreviaturas.**



ÍNDICE.....	VII
ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Osteoporosis postmenopáusica: concepto y aspectos epidemiológicos.....	3
1.1.1. Concepto de osteoporosis postmenopáusica .....	4
1.1.2. Epidemiología.....	6
1.1.3. Consecuencias y costes socioeconómicos.....	9
1.2. Factores de riesgo de osteoporosis y fractura.....	11
1.2.1. Factores de riesgo de osteoporosis.....	11
1.2.1.1. Factores genéticos.....	13
1.2.1.2. Factores nutricionales y estilo de vida.....	13
1.2.1.3. Enfermedades con influencia sobre masa ósea.....	15
1.2.2. Factores de riesgo de fractura.....	15
1.2.2.1. Masa ósea.....	15
1.2.2.2. Presencia de fractura previa por fragilidad.....	16
1.2.2.3. Edad.....	16
1.2.2.4. Sexo.....	17
1.2.2.5. Bajo peso.....	17
1.2.2.6. Factores de riesgo de caídas.....	17
1.2.3. Aplicación de los factores de riesgo en la práctica clínica.....	18
1.3. Evaluación del paciente con osteoporosis.....	20
1.3.1. Evaluación clínica.....	20
1.3.2. Determinaciones analíticas.....	20

1.3.3. Medición de la masa ósea.....	20
1.3.4. Evaluación radiológica.....	21
1.4. Remodelado óseo.....	22
1.4.1. Fisiopatología.....	23
1.4.2. Funciones.....	28
1.4.3. Regulación.....	29
1.5. Sistema OPG/RANKL.....	41
1.5.1. Descubrimiento y descripción del sistema OPG/RANKL..	41
1.5.2. Regulación del sistema OPG/RANKL.....	44
1.5.3. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades óseas y extraóseas.....	47
1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado.....	53
1.6.1. Utilidad de los marcadores de remodelado en osteoporosis postmenopausica.....	54
1.6.2. Relación entre marcadores de remodelado y OPG.....	58
1.7. Catepsina K y resorción ósea.....	59
1.8. Tratamiento de la osteoporosis postmenopausica con antirresortivos: resultados con alendronato.....	61
1.9. Cambios en OPG/RANKL y catepsina K en pacientes tratados con bifosfonatos.....	64
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. Objetivo general.....	79
2.2. Objetivos específicos.....	79
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. Población de estudio.....	73
3.2. Diseño del estudio.....	74

3.3. Determinaciones hormonales y marcadores de remodelado...	76
3.3.1. Determinaciones hormonales.....	76
3.3.2. Marcadores de remodelado.....	78
3.3.3. Estudio de marcadores de osteoclastogénesis.....	80
3.4. Técnicas radiológicas.....	81
3.4.1. Medición de masa ósea por DXA.....	81
3.4.2. Estudio radiológico.....	81
3.5. Análisis estadístico.....	82
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Características basales del grupo de estudio.....	85
4.2. Evolución de niveles séricos de calcio, fósforo, PTH-i y 25 OH vitamina D.....	88
4.3. Cambios en masa ósea.....	90
4.4. Cambios en marcadores de remodelado .....	95
4.5. Efecto del tratamiento sobre los niveles séricos de catepsina K .....	99
4.6. Cambios en sistema OPG/RANKL.....	102
4.7. Relación entre cambios en masa ósea, sistema OPG/RANKL y marcadores de remodelado.....	104
4.7.1. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en marcadores de remodelado.....	104
4.7.2. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en OPG/RANKL.....	107
4.7.3. Correlación entre cambios en marcadores de remodelado y cambios en OPG/RANKL.....	107

4.7.4. Capacidad de predicción de cambios en DMO columna lumbar en función de cambios en marcadores de remodelado, catepsina K y OPG/RANKL.....	108
5. DISCUSIÓN.....	113
6. CONCLUSIONES.....	129
7. BIBLIOGRAFÍA.....	133
8. ACTIVIDAD CIENTÍFICA.....	169
9. RESUMEN.....	175

ABREVIATURAS:

BSAP	Fosfatasa alcalina ósea
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
CF	Cuello femoral
CL	Columna lumbar
CSF	Factor estimulante de colonias
CT	Cadera total
CTX	Telopéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I
DE	Desviación estandar
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
DMO	Densidad mineral ósea
DPD	Puentes de piridolina
DXA	Densitometría dual rayos X
DYD	Puentes deoxipiridolina
EVOS	European Vertebral Osteoporosis Study
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago
IC	Intervalo de confianza
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGF-BP	Globulina Transportadora Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleukina
IMC	Índice masa coporal
INF	Interferón
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
M-CSF	Factor estimulante de macrófagos
NIH	National Institute of Health
NOF	National Osteoporosis Foundation
NTX	Telopéptido aminoterminal del procolágeno tipo I

OC	Osteocalcina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PICP	Propéptidos carboxiterminales del procolágeno tipo I
PINP	Propéptidos aminoterminales del procolágeno tipo I
PTH	Hormona paratiroidea
RANK	Receptor activador del nuclear factor kappa
RANKL	Ligando del Receptor activador del nuclear factor kappa
RR	Riesgo relativo
SEIOMM	Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral
SHBG	Sex Hormone Binding Protein
SOF	Study of Osteoporotic Fracturas
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa alcalina resistente a tartrato
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VSG	Velocidad de sedimentación globular

# **1. Introducción.**



# **1. INTRODUCCIÓN:**

## **1.1. Osteoporosis postmenopáusica: concepto y aspectos epidemiológicos.**

La osteoporosis postmenopausica es una enfermedad con una alta prevalencia, que afecta al 35% de las mujeres españolas mayores de 50 años y al 52 % de las mayores de 70 años, con un espectro clínico que abarca desde la ausencia de síntomas hasta la presencia de fracturas invalidantes como la fractura vertebral, o fracturas que asocian una elevada morbimortalidad como la fractura de cadera (Cummings SR et al., 2002).

Las fracturas secundarias a osteoporosis son una de las principales causas de incapacidad y muerte. El riesgo en vida de sufrir alguna de estas fracturas osteoporóticas para una mujer de 50 años se encuentra entre el 30-40% (Johnell O et al., 2005) siendo superior al de cáncer de mama (9-12%) y similar al de enfermedad cardiovascular (Sambrook P et al., 2006).

Es previsible un aumento de la incidencia de osteoporosis debido al envejecimiento progresivo de la población, ya que la prevalencia de baja masa ósea se eleva con la edad. Si en 1990 existían a nivel mundial 323 millones de personas con una edad superior a los 65 años, se calcula que en el año 2050 este número se habrá elevado hasta 1555 millones, lo que podría hacer que el número de fracturas de cadera a nivel mundial ascienda

de 1.7 millones en 1990 hasta una cifra estimada de de 6.3 millones en 2050 (Clifford J et al., 2005).

Se calcula que menos de un tercio de las pacientes que sufren una fractura por fragilidad son adecuadamente evaluadas para la presencia de osteoporosis a pesar del elevado riesgo de sufrir una nueva fractura osteoporótica que presentan (Elliot-Gibson V et al, 2004). Las tasas de diagnóstico son aun menores en aquellas pacientes que no presentan fracturas por fragilidad dado el carácter asintomático de la enfermedad.

Su elevada prevalencia, la asociación a fracturas invalidantes, y el hecho de que la osteoporosis sea una enfermedad que se puede prevenir y para la cual disponemos de tratamientos con beneficio demostrado, confieren una gran relevancia a este proceso.

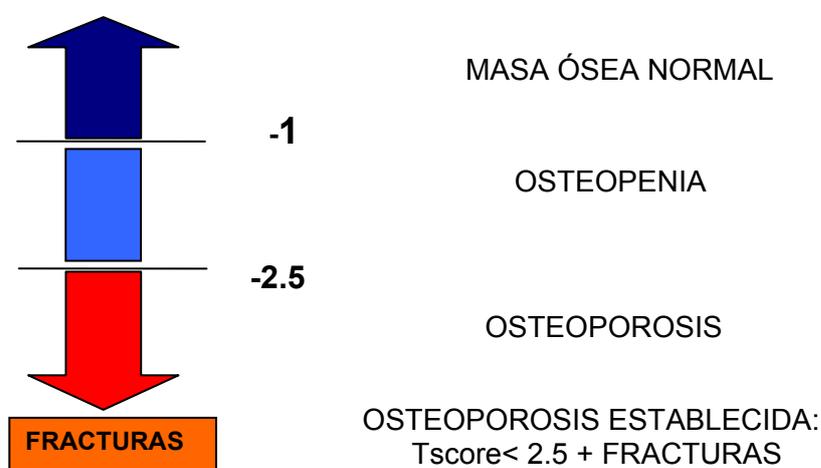
### **1.1.1. Concepto de osteoporosis postmenopáusica.**

La osteoporosis postmenopausica se define como “una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que predispone a un riesgo aumentado de fractura” (NIH Consensus, 2001). La resistencia ósea refleja fundamentalmente la unión de densidad y calidad óseas.

El concepto de calidad ósea pretende integrar todos aquellos factores ajenos a la masa ósea que condicionan la fragilidad del hueso, e incluye la microarquitectura, el grado de recambio, acumulo de lesiones o microfracturas y el grado de mineralización. (NIH Consensus 2001; SEIOMM 2002).

En 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los criterios diagnósticos de osteoporosis, válidos para mujeres de raza blanca, en función de los valores de masa ósea obtenidos en la densitometría (WHO Study Group, 1994). Así, se establece como normales valores de DMO superiores a -1 (DE) con relación a la media de adultos jóvenes (T score > -1); osteopenia valores de DMO entre -1 y -2,5 DE (T score comprendido entre -1 y 2,5); osteoporosis valores de DMO inferiores a -2,5 DE (T score inferior a -2,5) y osteoporosis establecida cuando alguna de las situaciones descritas asocia una ó más fracturas osteoporóticas (Figura 1.1). Esta clasificación ha sido posteriormente avalada por la ISCD (International Society for Clinical Densitometry) (Lewiecki M et al., 2004).

Figura 1.1: Criterios diagnósticos de osteoporosis de la OMS.



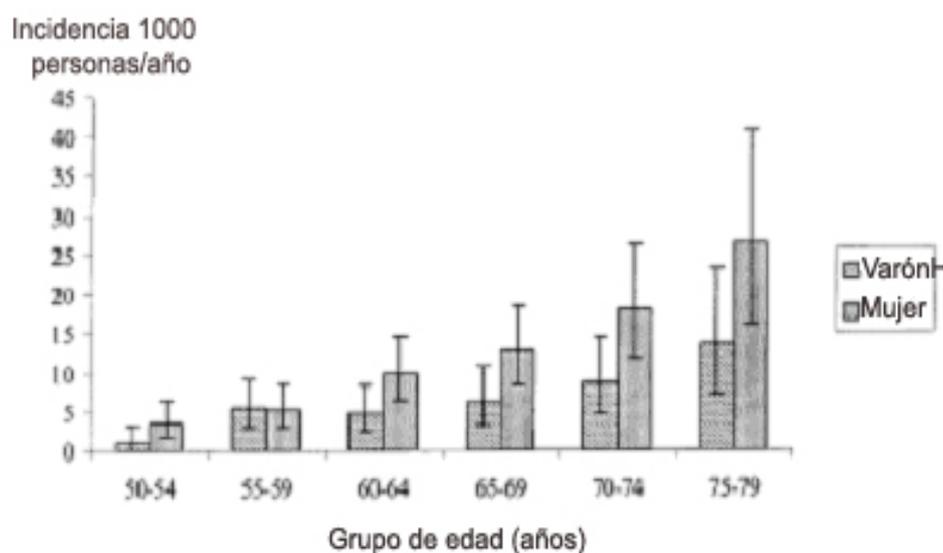
Existe el problema de cómo aplicar esta definición, basada en la masa ósea de mujeres de raza caucásica, a otros grupos de población: varones, niños, otras razas. En este caso es útil considerar el Z score, que expresa la masa ósea en comparación a la esperada para igual edad y sexo (Lewiecki EM et al., 2004). A pesar de que un valor bajo indica la existencia un descenso de la DMO, los criterios diagnósticos y umbrales de intervención y tratamiento están definidos en función del T score (Muñoz-Torres M et al., 2003; de la Higuera López-Frías M et al., 2004)

### **1.1.2. Epidemiología.**

En 1995 Melton y cols estimaron la prevalencia de osteoporosis según los criterios de la OMS en mujeres de raza blanca mayores de 50 años, siendo del 15% cuando se mide en una de las tres localizaciones habituales (columna, cadera o muñeca), y del 30% cuando se mide en todas ellas. La prevalencia para los distintos grupos de edad es de 15% para las edades comprendidas entre 50 y 59 años, 22% entre 60 y 69 años, 22% para edades entre 70 y 79 años, y una prevalencia superior al 80% para las mujeres con una edad superior a 80 años (Rosen CJ et al., 2005). En España la prevalencia de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas mayores de 50 años se encuentra entre el 35 y 40% (Muñoz-Torres M et al., 2003), y en cifras absolutas se estima que existen 2 millones de mujeres con osteoporosis (Díaz Curiel M, 2001).

La prevalencia de fractura vertebral está menos establecida debido a que no existe una definición universalmente aceptada y a que su presentación con frecuencia es asintomática. Entre un 20 y 25% de las mujeres mayores de 50 años presenta una fractura vertebral secundaria a osteoporosis según datos de estudios europeos (Roy DK et al., 2003). La incidencia anual se considera del 1% en mujeres de 65 años, 2% en las de 75 años y 3% en las mayores de 85 años. La mayor prevalencia de fractura vertebral respecto a fractura de cadera se explica por el alto porcentaje de ellas que son asintomáticas y por su presentación a una edad más temprana (De Laet C, 2000).

Figura 1.2: Incidencia de fractura vertebral en función de edad: Estudio EPOS. (Roy DK et al., 2003).



Las diferentes fracturas asociadas a la osteoporosis tienen una edad de presentación y factores de riesgo propios asociados. Así, la fractura de tercio distal de radio es más frecuente en mujeres perimenopausicas y su incidencia asciende rápidamente tras la menopausia para estabilizarse a los 65 años (Honkanen RJ et al., 2000).

La incidencia de fractura de cadera es variable según la población analizada, de manera que entre distintos países europeos difiere hasta 7 veces (Johnell O et al., 2005). La frecuencia es el doble para las mujeres, y aunque su presencia se asocia estrechamente con la densidad mineral ósea existen numerosos factores de riesgo predictores de fractura de cadera independientes de la DMO (Kanis JA et al., 2003), lo que puede explicar parte de esta variabilidad.

En España la incidencia anual de fractura de fémur en mujeres con una edad superior a 50 años es de 3 por 1000, y el doble para la fractura de tercio distal de radio. En la actualidad el riesgo de padecer una fractura de fémur en lo que le resta de vida para una mujer española de 50 años oscila entre un 12-16%. La presencia de fracturas, especialmente la de fémur, produce un aumento de la mortalidad con relación a las pacientes sin fractura (Grupo de trabajo de la SEIOMM 2002).

### **1.1.3. Consecuencias y costes socioeconómicos de la osteoporosis.**

La consecuencia más directa de la osteoporosis es el incremento de la incidencia de fracturas. Se definen como fracturas osteoporóticas aquellas que se localizan en zonas de baja DMO y que presentan una mayor incidencia en mayores de 50 años (Kanis JA et al., 2001), o bien aquellas que ocurren tras una caída desde la propia altura. Las fracturas típicamente asociadas con la osteoporosis son las de cadera, vertebrales y tercio distal del radio, aunque resultados de amplios estudios prospectivos muestran que casi todos los tipos de fractura están aumentados en pacientes con baja DMO, y que el hecho de presentar una fractura en cualquier localización aumenta entre el 50 y 100% la posibilidad de presentar una nueva fractura (Klotzbuecher CM et al., 2000; Wu F et al., 2002).

La presencia de fracturas por fragilidad se asocia a un mayor riesgo de presentar nuevas fracturas osteoporóticas, así como a un incremento de la mortalidad y una disminución de la calidad de vida. Así, la presencia de fractura vertebral previa aumenta en cinco veces la probabilidad de sufrir una nueva fractura vertebral, y dos veces la de fractura no vertebral (Lindsay R et al., 2005). De igual manera el presentar una fractura de cadera incrementa la posibilidad de fractura vertebral única o múltiple y de otras fracturas como la de tercio distal de radio (van Staa TP et al., 2002).

Datos recientes indican que la reducción de la calidad de vida asociada a la presencia de fractura vertebral clínica es al menos tan importante como la de la fractura de cadera, por lo que la morbilidad de la fractura vertebral ha podido ser infraestimada hasta ahora (Johnell O 2005; Fechtenbaum J et al., 2005). Existe además un aumento de la mortalidad asociada a la presencia de fractura vertebral clínica según muestran los estudios EVOS (European Vertebral Osteoporosis Study) y SOF (Study of Osteoporotic Fractures) (Hasserijs R et al., 2003; Ensrud KE et al., 2000). La repercusión de la fractura de tercio distal del radio es menor (Johnell O et al., 2004) aunque hasta en un tercio de los casos permanecen secuelas en cuanto a grado de movilidad y fuerza.

El impacto sobre la calidad de vida de la fractura de cadera es considerable como consecuencia de la hospitalización, disminución de la capacidad física y de independencia para ciertas actividades. La mitad de las pacientes pierden la capacidad de deambulación sin ayuda, y de aquellas que eran independientes previamente a la fractura la mitad necesitan cuidados o institucionalización tras esta (Formiga F et al., 2004). La presencia de fracturas y especialmente la de fémur produce un aumento de la mortalidad con relación a las pacientes sin fractura (Grupo de trabajo de la SEIOMM 2002). Entre el 10 y 20% de las mujeres mueren en el primer año tras una fractura de cadera, con un mayor riesgo inmediatamente tras la fractura y que decrece con el tiempo. Este aumento de mortalidad se debe en gran medida a patologías crónicas asociadas y a complicaciones postoperatorias más que a la propia fractura (Chevaley T et al., 2002).

Se calcula que en España la mortalidad debida a fractura de cadera oscila entre el 5 y el 8 % durante el primer ingreso, y entre el 14 y el 36% durante el primer año (Formiga F et al., 2004) siendo entre todas las fracturas la que mayor morbimortalidad genera y provocando largas estancias hospitalarias (Brossa A et al., 2005). La morbimortalidad de las fracturas de cadera en relación con su prevalencia es comparable a la del cáncer de mama, de útero y de ovario combinado (NOF, 2003).

## **1.2. Factores de riesgo de osteoporosis y fractura.**

Se han descrito multitud de factores de riesgo de osteoporosis y fractura. Algunos de ellos han demostrado plenamente su influencia como es el caso de la edad, el sexo, la DMO o la etnia, mientras que para otros factores los resultados procedentes de estudios epidemiológicos no son concluyentes.

### **1.2.1. Factores de riesgo de osteoporosis.**

Estos factores de riesgo pueden ser constitucionales y por lo tanto no modificables como es el caso de la menarquia tardía o los antecedentes familiares de osteoporosis. Otros sin embargo si pueden ser modificados, como el uso de ciertos fármacos (anticonvulsivantes, corticoides) y enfermedades de conocida influencia sobre el metabolismo mineral (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo) (Stein E et al., 2003).

Existen multitud de estudios donde se identifican factores de riesgo en base a diferentes poblaciones, calculando el riesgo relativo para fracturas en distintas localizaciones. La escasa capacidad de predicción en conjunto de estos factores quedó de manifiesto en el Study of Osteoporotic Fractures (SOF), donde se analizaron datos transversales procedentes de una cohorte de 9500 mujeres. El conjunto de parámetros independientes de predicción solo explicaba entre el 20 y el 34% de la variación de la DMO en las diferentes localizaciones esqueléticas (Melton LJ et al., 2003).

La tabla 1.1 recoge diferentes factores constitucionales, nutricionales, médicos y farmacológicos con influencia sobre la masa ósea.

Tabla 1.1: Factores de riesgo de osteoporosis (Adaptado de Kanis JA 2002).

Estatus estrogénico	Menopausia precoz (menor 45 años) Hipogonadismo primario Amenorrea de duración superior a 1 año
Tratamiento esteroideo	Prednisona 7.5 mg/día (o equivalente) durante 6 meses o más
Antecedente materno de fractura de cadera	
IMC bajo	Inferior a 19 kg/m <sup>2</sup>
Otras situaciones	Anorexia nerviosa Síndrome malabsorción Postrasplante Insuficiencia renal crónica Hipertiroidismo Síndrome de Cushing Hiperparatiroidismo Inmovilización prolongada

### **1.2.1.1. Factores genéticos.**

La influencia genética determina un menor pico de masa ósea en individuos con historia familiar de osteoporosis. Numerosos genes han sido identificados como determinantes de la masa ósea, entre ellos los que codifican el receptor de la vitamina D (Quesada JM et al., 2004), receptor estrogénico, colágeno tipo I (Mezquita Raya et al., 2002), IGF 1, TGF  $\beta$ , BMPs y otros, si bien no está establecida la contribución exacta de cada gen y la aplicación de estos datos en poblaciones distintas a las estudiadas (Albagha OM et al., 2003).

### **1.2.1.2. Factores nutricionales y estilo de vida.**

Numerosos factores nutricionales influyen tanto en la adquisición como en el mantenimiento de una adecuada masa ósea, y entre ellos destacan por su relevancia el calcio y la vitamina D. El consumo de leche en la adolescencia se relaciona con la masa ósea en la edad adulta (Whitting SJ et al., 2004), y una ingesta adecuada a lo largo de la vida con una menor incidencia de fracturas osteoporóticas (Kalkwarf HJ et al., 2003). No basta con una adecuada ingesta de calcio, sino que existen otros factores que influyen en su balance. Un consumo elevado de sodio y proteínas aumenta la excreción urinaria de calcio, con una marcada influencia en caso de bajo consumo de calcio (Heaney RP 2000). Niveles adecuados de vitamina D, superiores a 30 ng/ml (Heaney RP 2003; Holick MF 2006) evitan el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis. También se propone su papel sobre la fuerza muscular y el riesgo de caídas, especialmente en pacientes ancianos (Bischoff-Ferrari HA et al., 2004).

Otros factores nutricionales que han demostrado su influencia en los últimos años son la vitamina K (Weber P 2001; Okano T 2005) asociada de forma positiva con masa ósea y riesgo de fractura, y la vitamina C necesaria para el metabolismo del colágeno (Nieves JV 2005). Niveles elevados de homocisteína se asocian a menor masa ósea y aumento de fracturas, probablemente por su asociación con déficits de vitaminas del grupo B (Mac Lean RR et al., 2004).

Datos recientes procedentes del estudio global de diez cohortes a nivel mundial identifican al tabaco como un factor de riesgo de osteoporosis y fractura (Kanis JA et al., 2005). El hecho de ser fumador activo supone un riesgo relativo de fractura de 1.13 tras ajustar por DMO, especialmente para fractura de cadera (RR 1.6) y con un riesgo mayor para varones excepto para fractura de cadera. El consumo de tabaco en el pasado se asocia a mayor riesgo de fractura en cualquier localización, pero menor que para el consumo activo.

Los efectos del consumo de alcohol sobre masa ósea y riesgo de fracturas no habían sido determinados de forma concluyente. Tras analizar datos de tres estudios prospectivos, Kanis y colaboradores concluyen que existe una asociación no lineal entre ingesta de alcohol y riesgo de fractura, de forma que la ingesta inferior a dos unidades no supone un aumento del riesgo. La ingesta por encima de este umbral conlleva un aumento del riesgo de fractura y especialmente osteoporóticas (RR 1.38) con especial influencia sobre la fractura de cadera (RR 1.68) (Kanis JA et al., 2005). No se identificaron diferencias en cuanto a sexo, edad o DMO.

### **1.2.1.3. Enfermedades con influencia sobre masa ósea.**

Son varias las enfermedades endocrinológicas que se asocian a osteoporosis, entre ellas el hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, el hipercortisolismo y la diabetes tipo 1. Otras enfermedades no endocrinas con influencia sobre la masa ósea son las hepatopatías, mieloma múltiple, y enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide.

Diversos tratamientos de amplio uso ejercen un efecto negativo sobre la masa ósea que conlleva un aumento del riesgo de fractura, entre ellos se encuentran los corticoides (Steinbuch M et al., 2004), inmunosupresores, anticonvulsivantes y citostáticos.

## **1.2.2. Factores de riesgo de fractura.**

### **1.2.2.1. Masa ósea.**

Numerosos estudios transversales y prospectivos indican que el riesgo de fractura aumenta entre 1.4 y 2.6 veces por cada desviación estándar que disminuye la DMO, medida que refleja la masa ósea de un individuo (Rosen CJ 2005). La medición en localizaciones específicas permite una mayor precisión en la predicción del riesgo de fractura en cada localización. Así, un T score en cadera de -3 supone un riesgo 15 veces mayor del riesgo de fractura, mientras que igual valor en columna lumbar eleva el riesgo en 4 veces (Kanis JA et al., 2001).

En mujeres postmenopausicas recientes la medición de DMO en cualquier localización predice cualquier fractura osteoporótica con un gradiente de riesgo de aproximadamente 1.5 por cada desviación estándar que disminuye la DMO (Kanis JA et al., 2005).

### **1 2.2.2. Presencia de fractura previa por fragilidad.**

Constituye el más importante factor de riesgo de fractura independiente de la masa ósea, y en general aumenta el riesgo al doble (Johnell O et al., 2001) aunque en el caso de la fractura vertebral la influencia es mayor con un aumento del riesgo entre 4 y 5 veces. Es importante destacar que el riesgo es mayor en el primer y segundo año tras la primera fractura (Lindsay R et al., 2001; van Staa TP et al., 2002).

### **1.2.2.3. Edad.**

La edad contribuye al riesgo de fractura como un factor independiente de la DMO (Kanis JA 2002) por lo que para cualquier valor de densidad mineral ósea el riesgo de fractura es mucho mayor para edades más avanzadas (McClung MR 2005). El riesgo relativo aumenta de 2 a 3 veces por cada década tras los 50. Esta influencia hace que, aunque en función de los cambios en DMO seria esperable una incidencia 4 veces mayor de fractura de cadera entre los 50 y los 80 años, en realidad la incidencia sea 30 veces superior.

#### **1.2.2.4. Sexo.**

Las mujeres presentan una mayor incidencia de osteoporosis y de fracturas asociadas, con una prevalencia de 15-20:1 respecto al hombre. Esto es debido a varios factores entre los que se encuentran un menor pico de masa ósea y el cese brusco de la actividad estrogénica tras la menopausia que ocasiona un marcado descenso de la masa ósea en los primeros años de postmenopausia (Riggs BL et al., 2002).

#### **1.2.2.5. Bajo peso.**

Varios estudios han señalado que un peso inferior a 57 kg se asocia a un mayor riesgo de fractura, especialmente de cadera. La talla baja y un IMC inferior a 19 kg/m<sup>2</sup>, así como el menor porcentaje de grasa corporal, también se asocia a baja DMO (De Laet C et al., 2005).

#### **1.2.2.6. Factores de riesgo de caídas.**

Las situaciones clínicas relacionados con una mayor incidencia de caídas se asocian principalmente con la fractura de cadera. Diversos estudios han comprobado la importancia de estos factores, uno de ellos es el EPIDOS que destaca como más importantes las alteraciones neuromusculares, agudeza visual y el antecedente de caída previa. La influencia del uso de ansiolíticos y neurolépticos se ha revisado recientemente demostrándose la existencia de una relación dosis-respuesta ente su uso y un mayor riesgo de fractura por un incremento en las caídas (Vestegaard P et al., 2006).

Tabla 1.2: Factores de riesgo de fractura de la World Health Organization

<b>FACTORES DE RIESGO DE FRACTURA WHO</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Edad</b></li><li>• <b>Sexo</b></li><li>• <b>Antecedente de fractura (a una edad superior a 50 años)</b></li><li>• <b>Baja DMO</b></li><li>• <b>Historia materna de fractura</b></li><li>• <b>Bajo BMI</b></li><li>• <b>Habito tabaquico activo</b></li><li>• <b>Consumo alcohol</b></li><li>• <b>Tratamiento con corticoides</b></li><li>• <b>Causas secundarias</b></li></ul>

### **1.2.3. Aplicación de los factores de riesgo en la práctica clínica.**

Los factores de riesgo clínicos en general tienen una escasa sensibilidad y especificidad en la predicción de baja masa ósea o del riesgo de fractura. En algunos casos los resultados procedentes de diferentes estudios para un factor de riesgo en concreto son contradictorios (Espallargues M et al., 2001). Además la importancia de algunos de ellos se modifica con la edad, como es el caso de la alteración de la agudeza visual y el uso de sedantes, factores de riesgo para caídas con una capacidad de predicción más importante en pacientes ancianos respecto a pacientes jóvenes (Kanis JA et al., 2002). Otra limitación es determinar en que medida aumenta el riesgo de fractura cuando se combinan varios factores de riesgo.

Existen diversas tablas que permiten calcular el riesgo de fractura a 10 años en función de la edad y la DMO. También se han desarrollado escalas pronósticas cuya limitación más importante es la falta de validación y generalización para todas las poblaciones. Una de estas escalas es la propuesta por la Internacional Osteoporosis Foundation, que considera cinco factores de riesgo como los de mayor importancia en mujeres postmenopausicas blancas (Tabla 1.5). Se ha propuesto que la presencia de estos factores de riesgo justificaría la realización de una densitometría antes de la edad de 65 años recomendada para la población general (Cummings SR 2002; NOF 2003).

Tabla 1.3: Factores de riesgo de fractura osteoporótica (NOF).

FACTORES DE RIESGO FRACTURA OSTEOPORÓTICA: (Nacional Osteoporosis Foundation)
Edad
Antecedentes familiares de fractura por fragilidad
Antecedentes personales de fractura previa por fragilidad
Peso corporal inferior a 57.6 kg
Hábito tabáquico activo

### **1.3. Evaluación del paciente con osteoporosis.**

#### **1.3.1 Evaluación clínica.**

La anamnesis del paciente que acude para valoración de osteoporosis debe incluir los siguientes aspectos: antecedentes familiares y personales (endocrinopatías, otras enfermedades o tratamientos con influencia sobre la masa ósea, fracturas previas); historia hormonal y reproductiva (edad de menarquia y menopausia, número de embarazos, lactancia); hábitos tóxicos y encuesta dietética dirigida a consumo de calcio y vitamina D; estilo de vida y exploración física (frecuencia cardiaca, deformidades óseas, imposibilidad para levantarse de la silla sin usar los brazos).

#### **1.3.2. Determinaciones analíticas.**

La realización de las siguientes determinaciones permiten excluir causas secundarias de osteoporosis: hemograma con VSG, bioquímica básica incluyendo función renal, hepática y calcemia, función tiroidea, niveles de 25 OH vitamina D y PTH-i.

#### **1.3.3. Medición de masa ósea.**

Actualmente no existen métodos que permitan medir la calidad ósea independientemente de la densidad en la práctica clínica, por lo que a efectos prácticos el diagnóstico de osteoporosis se realiza en base a la medición de la masa ósea.

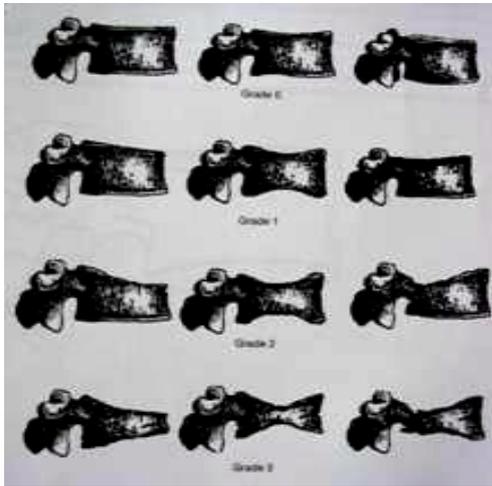
Existen varios métodos disponibles para la medición de la DMO, de los cuales el patrón oro es la absorciometría dual de rayos X (DXA). La medición de la DMO por densitometría permite establecer la presencia de osteoporosis en función de los criterios de la OMS. En la práctica clínica diaria suele realizarse en dos localizaciones, columna lumbar y fémur proximal. La medición en columna vertebral analiza las vértebras L2 a L4 lumbares y refleja fundamentalmente el hueso trabecular. A nivel de fémur proximal se consideran a su vez varias regiones: cuello femoral, trocánter, triángulo de Ward y cadera total. Con fines diagnósticos se utilizan los valores en cuello femoral y cadera total ya que las otras dos medidas tienen menor precisión.

#### **1.3.4. Evaluación radiológica.**

Aunque la osteoporosis postmenopáusica presenta un patrón característico de resorción de hueso trabecular e intracortical, la radiología simple no es un buen método diagnóstico de osteoporosis por su escasa precisión. Sin embargo es importante la realización de radiografías de columna en la paciente con osteoporosis postmenopáusica ya que permite detectar la presencia de fracturas vertebrales asociadas que por su carácter asintomático hayan pasado desapercibidas.

Las fracturas vertebrales pueden ser bicóncavas, en cuña o por aplastamiento. El método de Genant clasifica las deformidades vertebrales en cuatro grados (Figura 1.3).

Figura 1.3: Clasificación de la fractura vertebral: Criterios de Genant.



<b>GRADO 0:</b> normal
<b>GRADO 1:</b> deformidad leve. Reducción altura anterior, media o posterior entre 10 y 20%
<b>GRADO 2:</b> deformidad moderada. Reducción entre 25 y 40%.
<b>GRADO 3:</b> deformidad severa. Reducción 40% de cualquier altura del cuerpo vertebral.

#### **1.4. Remodelado óseo.**

El hueso es un tejido conectivo formado por una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El componente orgánico más abundante en la matriz es el colágeno tipo I que supone un 90 % mientras que el otro 10% está integrado por proteínas no estructurales como osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. El componente inorgánico fundamental son los cristales de hidroxapatita, cuya unión a las fibras de colágeno confiere al hueso sus características principales de rigidez, flexibilidad y resistencia.

### **1.4.1. Fisiopatología.**

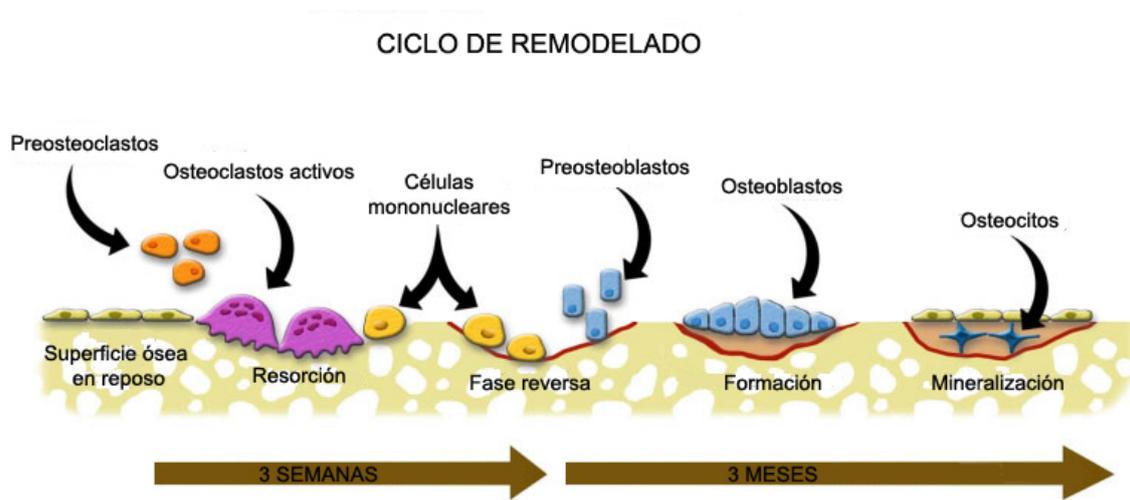
El hueso es un tejido metabólicamente activo que sufre un continuo proceso de remodelado. Este proceso supone la renovación del 3-4 % del hueso cortical y entre un 25-30 % del trabecular al cabo del año, lo que en conjunto conlleva la renovación total del esqueleto al cabo de diez años. El remodelado no solo mantiene la masa ósea, sino que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional.

En los individuos jóvenes el remodelado mantiene la masa esquelética prácticamente invariable. El envejecimiento, la menopausia y distintas enfermedades alteran el balance del remodelado hacia un predominio de la resorción sobre la formación, lo que ocasiona una pérdida ósea y como consecuencia, osteoporosis. El hueso trabecular es más sensible a las alteraciones del balance óseo debido a su mayor superficie.

El proceso de remodelado tiene lugar en las unidades básicas de remodelado (BMU), formadas por los tres tipos celulares presentes en el hueso. La unidad de remodelado se compone de un frente de osteoclastos seguido de un grupo de osteoblastos, un aporte vascular y nervioso, y tejido conectivo (Jilka RL 2003). Su vida media es entre seis y nueve meses y se calcula que en un determinado momento están activas entre 1.5 y 2 millones de estas unidades.

El remodelado óseo consta de cuatro fases sucesivas: activación, resorción, inversión y formación (Figura 1.4).

Figura 1.4: Esquema del ciclo de remodelado.



La **fase de activación** comienza con el reclutamiento de precursores mononucleares de la serie promonocítica presentes en la médula y sangre circulante. Las vías de señalización que intervienen en el desarrollo de la fase de activación no se conocen en su totalidad.

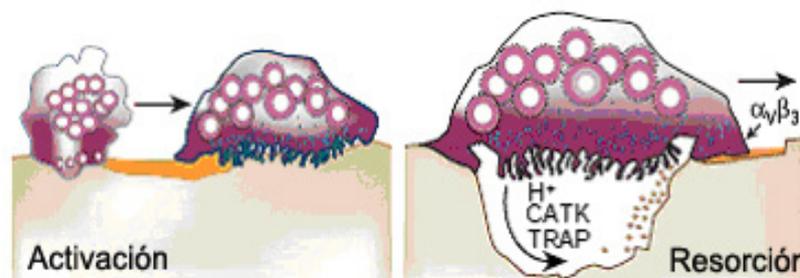
El remodelado se desarrolla de manera simultánea en múltiples unidades de remodelado, lo que apoya su regulación por factores del microambiente óseo. También se ha demostrado la influencia de factores hormonales, fuerzas mecánicas locales y cambios ocurridos en el hueso como consecuencia del envejecimiento o daños por fatiga (Manolagas SC 2000).

Durante el proceso de osteoclastogénesis los precursores de la serie monocito macrófago se diferencian a osteoclastos en la superficie ósea o cerca de ésta por acción de de dos factores hematopoyéticos, RANKL y CSF 1 (Boyle WJ 2003) que inducen la expresión de los genes propios de la estirpe osteoclástica: catepsina K, TRAP y  $\beta 3$  integrina.

Los osteoclastos se encuentran en la superficie ósea sobre un lecho de células fusiformes de estirpe osteoblástica, las células de revestimiento, que durante la resorción se retraen permitiendo la formación del borde rugoso del osteoclasto y la resorción de la zona expuesta.

Figura I.5: Activación y diferenciación osteoclastica:

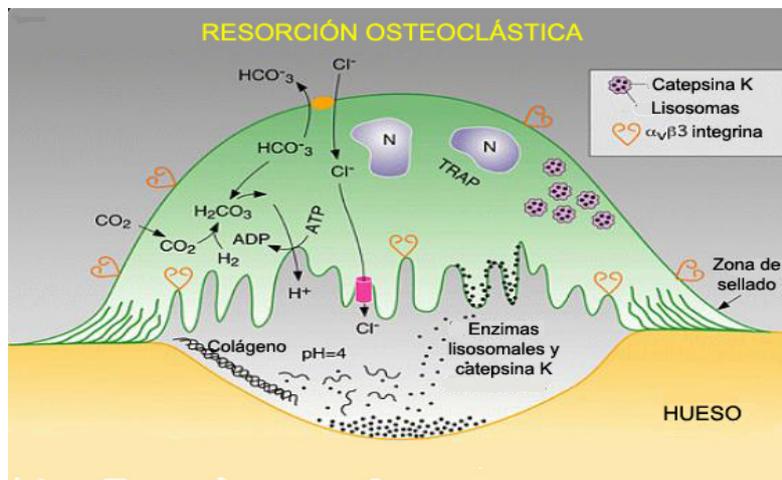
Adaptado de Boyle WJ 2003.



En respuesta de la activación de RANK por su ligando específico (Muñoz-Torres et al., 2004) el osteoclasto se polariza y sufre una serie de cambios en su estructura que le preparan para el proceso de resorción, como la reordenación del citoesqueleto y la formación de una zona de sellado entre su membrana basal y la superficie de resorción. Los osteoclastos diferenciados liberan a la laguna de resorción distintas enzimas proteolíticas junto a hidrogenoiones que favorecen la creación del pH ácido necesario para la activación de dichas enzimas. La acidificación del medio también contribuye a la desmineralización de la matriz para la posterior degradación por las enzimas proteolíticas.

La catepsina K es la principal enzima expresada por los osteoclastos (Goto T et al., 2003) que también expresan fosfatasa ácida resistente al tartrato. Los productos de degradación son procesados en el interior del osteoclasto y liberados a la circulación.

Figura 1.6: Enzimas implicadas en la actividad del osteoclasto.



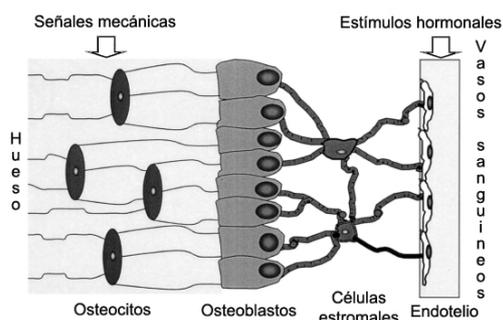
La fase de resorción finaliza con la apoptosis osteoclástica, proceso regulado por diversos factores entre los que destaca por su importancia TGF  $\beta$  que además inhibe la apoptosis de los osteoblastos (Parfitt AM 2002).

En la **fase de formación** las células precursoras de osteoblastos son atraídas a la zona de resorción gracias a la acción conjunta de diversos factores quimiotácticos liberados de la matriz ósea durante la resorción: TGF  $\beta$ , colágeno tipo I, PDGF e IGF I y II (Dallas SL et al., 2002). Las células mesenquimales pluripotenciales precursoras de osteoblastos se

diferencian y proliferan a través de la activación de distintos genes como el de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina o el colágeno tipo I, proceso mediado por IGF I y BMP 2 (Kawaguchi J et al., 2005). Esta fase de formación integra a su vez dos procesos: la síntesis de osteoide, tejido óseo nuevo sin mineralizar, y la fase posterior de mineralización.

Se considera que tras completar este periodo la mitad de los osteoblastos mueren por apoptosis y los restantes se transforman en células de superficie (*lining cells*) que recubren el hueso recién formado o quedan enterrados en el tejido óseo transformándose en osteocitos. Los osteocitos conectan entre sí y con los osteoblastos y *lining cells* de la superficie mediante una red de prolongaciones citoplasmáticas que forman un sistema canalicular (Stains JP et al, 2005) (Figura 1.7).

Figura 1.7: Sistema canalicular (Adaptado de: Plotkin LI et al., 1999).



Los procesos de apoptosis que afectan a las células óseas y que regulan su vida media son un importante determinante de la masa ósea y su resistencia (Xing L et al., 2005). Así, el descenso de la apoptosis de

osteoclastos por déficit estrógeno tras la ovariectomía produce una reducción de la masa ósea (Manolagas SC et al., 2002).

El proceso de resorción llevado a cabo por los osteoclastos estimula la síntesis de hueso nuevo por los osteoblastos adyacentes. Este proceso se denomina acoplamiento y está regulado entre otras citoquinas por el sistema OPG-RANKL. La expresión coordinada de OPG y RANKL regula la resorción de manera tanto positiva como negativa controlando la activación de RANK en los osteoclastos (Udagawa N et al, 2000). En la coordinación del proceso de remodelado son también fundamentales los mecanismos intercelulares de señalización que permiten sincronizar sus acciones, difundir señales autocrinas y coordinar respuestas a estímulos hormonales. Datos recientes destacan la importancia de las integrinas en el proceso de osteogénesis (Marie PJ, 2002), en la transmisión de estímulos mecánicos entre osteoblastos y osteocitos (Plotkin LJ et al., 2005) y en la regulación de la apoptosis, especialmente en la inducida por bifosfonatos (Plotkin LJ et al., 2002).

#### **1.4.2. Funciones del remodelado.**

Se considera que la principal función del proceso de remodelado es el mantenimiento de las características mecánicas del hueso a través de la sustitución de las zonas dañadas por hueso nuevo. También es responsable de la organización espacial del hueso a la carga mecánica experimentada en cada momento y contribuye a la homeostasis mineral y especialmente al balance fosfocálcico.

### **1.4.3. Regulación.**

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de los factores que intervienen en la regulación del proceso de remodelado, a pesar de lo cual quedan por aclarar muchos aspectos. Su regulación es compleja ya que integra diversos estímulos como son factores mecánicos, hormonales, citoquinas y factores de crecimiento. Muchos de estos factores ejercen efecto sobre osteoblastos y osteoclastos, o bien actúan estimulando a su vez una cascada de señales.

#### **1.4.3.1. Factores mecánicos.**

La influencia de los factores mecánicos sobre el remodelado queda de manifiesto en la pérdida de masa ósea inducida por la falta de actividad física. El ejercicio físico moderado e intenso tiene un efecto positivo sobre la masa ósea, que se reduce con la edad por el deterioro de las células mecanosensoras del hueso.

El mecanismo por el cual el hueso detecta y traduce los estímulos físicos, y como estas señales se traducen en señales biológicas y de expresión génica no se conoce en su totalidad (Burgger EH et al., 2003). Las fuerzas mecánicas inducidas sobre el hueso son detectadas por los osteocitos conectados entre sí y con las *lining cells* por un sistema canalicular (Noble BS et al., 2003). Los microdaños por fatiga inducen la apoptosis de osteocitos en las zonas adyacentes, seguido de la resorción de los sitios afectados (Bakker A et al., 2004).

En estudios con animales se ha comprobado como la carga mecánica estimula la transformación de las células del endostio en osteoblastos (Noble BS et al, 2003) además de estimular factores de transcripción de forma proporcional a la carga (Rubin J et al., 2006).

#### **1.4.3.2. Factores humorales.**

##### **A) Factores sistémicos:**

##### **Hormona calciotropas:**

##### **Parathormona:**

Los efectos de la PTH sobre el hueso son complejos y no están totalmente aclarados. Niveles elevados de forma continuada producen un aumento de la actividad osteoclástica, mientras que su administración intermitente tiene efectos anabólicos a través de un aumento del número de osteoblastos y de la tasa de formación (Cosman F et al., 2004).

La PTH estimula la secreción de RANKL, IGF-1 e ILs 6 y 11 por los osteoblastos lo que activa la diferenciación y función osteoclástica. Esta activación se produce de forma indirecta aunque los osteoclastos expresan receptores para PTH (Demster DW et al., 2005). Otros efectos de la PTH son la transformación de osteocitos en osteoblastos activos (Langub et al., 2001) y el aumento de la vida media de estos por disminución de la apoptosis (Bringhurst FR et al., 2002).

### **Calcitriol:**

Aunque su efecto sobre el remodelado es difícil de estudiar por sus múltiples acciones, estimula la resorción ósea a través de su acción sobre osteoclastos y sus precursores (Gurlek A et al., 2002). Entre sus acciones se incluye el aumento de la absorción intestinal de calcio y la inhibición de la secreción de PTH actuando sobre las paratiroides, e interviene también en la mineralización ósea (Van Leeuwen JP et al., 2001).

### **Calcitonina:**

*In vitro* inhibe la acción de los osteoclastos tras inducir un descenso en el número de receptores, aunque se desconoce la trascendencia biológica de esta acción (Zaidi M et al., 2002). Algunos autores proponen además acciones sobre los osteoblastos, aunque otros cuestionan su papel en la fisiología del hueso. El aumento observado de los niveles de calcitonina durante el crecimiento, el embarazo y la lactancia apoyan su papel en el mantenimiento de la masa ósea.

### **Hormonas sexuales:**

Las hormonas sexuales desempeñan un importante papel tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la masa ósea. Tradicionalmente se ha considerado que el papel de estrógenos y testosterona era específico del sexo, aunque en la actualidad se sabe que ambos tipos de hormonas desempeñan acciones en el hueso ya que las sus células expresan receptores

para estrógenos y testosterona independientemente del sexo (Khosla S 2002).

Las hormonas sexuales ejercen un efecto positivo sobre la masa ósea ya que inhiben la formación ósea y estimulan la formación. El efecto antirresortivo de los estrógenos es más potente, y aunque ambos estimulan la formación ósea la testosterona influye fundamentalmente sobre osteoblastos maduros y osteocitos, mientras que los estrógenos regulan la actividad osteoblástica en distintas fases de su desarrollo (Syed F et al., 2005).

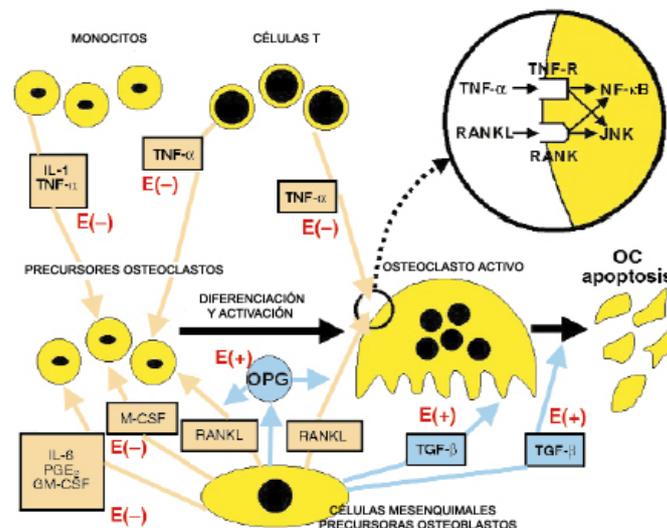
### **Estrógenos:**

Los estrógenos desempeñan un papel fundamental en el metabolismo óseo. Este hecho queda de manifiesto en la pérdida de masa ósea que ocurre en los primeros años de postmenopausia tras el cese de la actividad estrogénica que ocasiona un aumento del remodelado (Riggs BL et al., 2002) debido a la elevación de distintas citoquinas proresortivas como IL 1, M-CSF y TNF  $\alpha$  (Linderg MK et al., 2001).

Sus efectos sobre las células óseas están mediados por dos clases de receptores estrogénicos expresados en citoplasma y núcleo: el alfa, presente en osteoblastos y osteoclastos, y el beta, expresado solo por osteoblastos. Los estrógenos ejercen además sus efectos positivos a través de un efecto paracrino (Manolagas SC et al., 2002).

El papel de los estrógenos *in vitro* es la inhibición del desarrollo de los osteoclastos favoreciendo su apoptosis por estímulo de la producción de TGF  $\beta$  por los osteoblastos (Huber DM et al., 2001) además de inhibir la producción de IL 6, el principal estímulo para la resorción (Pleilschifter J et al., 2002). Previenen también la apoptosis osteoblástica (Kousteni S 2001). La deficiencia estrogénica incrementa además la apoptosis de los osteocitos (Kousteni S 2001), lo que se ha propuesto que altera la función mecanosensora del sistema canalicular de reparación de microdaños contribuyendo a la fragilidad ósea.

Figura 1.8: Efectos estrogénicos sobre el remodelado (Adaptado de Riggs BL 2000)



Aunque los andrógenos desempeñan funciones similares *in vitro* (Khosla S et al., 2003) en general los estudios que han investigado los efectos de los andrógenos sobre las células óseas no arrojan resultados tan concluyentes como los realizados con estrógenos, tanto para los efectos sobre producción de citokinas como sobre proliferación y diferenciación osteoblástica (Khosla SF 2005).

El papel de los estrógenos sobre la adquisición de la masa ósea y el desarrollo del esqueleto masculino se conocen a partir de la experiencia de pacientes con defectos genéticos del gen de la aromatasasa, en los que a pesar de niveles elevados de andrógenos existía una baja masa ósea y que respondía a la administración de estrógenos (Hermann BL et al., 2002). Las acciones estrogénicas sobre la masa ósea del varón se realizan fundamentalmente a través del receptor alfa como se ha demostrado en estudios con ratones *knout out* (Vidal O et al., 2000).

Estudios transversales y posteriormente prospectivos han demostrado el efecto de mantenimiento de la masa ósea adquirida. Slemenda y cols demostraron la correlación entre los valores de masa ósea en varones con una edad superior a 55 años y los niveles séricos de estradiol, especialmente la fracción no unida a SHBG. Posteriormente un estudio longitudinal de Koshla y cols mostró una estrecha correlación entre los niveles de estradiol biodisponible en suero y la masa ósea en varones, tanto en jóvenes como en ancianos. Finalmente en un estudio de intervención en el que se bloqueó la producción de estrógenos y andrógenos en varones ancianos solo los estrógenos fueron capaces de inhibir la resorción, mientras que la administración de testosterona fue mucho menos eficaz. Estudios posteriores han confirmado el papel dominante de los estrógenos en el metabolismo óseo del esqueleto adulto del varón.

El efecto antirresortivo más potente de los estrógenos y su importante papel en la masa ósea de los varones puede explicarse por los diferentes efectos ejercidos sobre la producción de OPG. Tanto *in vivo* (Khosla SF 2002) como *in vitro* (Hofbauer LC 1999) los estrógenos estimulan la producción de OPG

y suprimen la de RANKL, mientras que la testosterona inhibe ambas moléculas (Khosla SF et al., 2002). Es posible que exista un efecto diferencial sobre otras moléculas reguladoras de la osteoclastogénesis.

### **Andrógenos:**

Los principales efectos de los andrógenos tanto en varones como en mujeres son incrementar el tamaño óseo y estimular la formación, con algún efecto de inhibición de la resorción ósea. La mayoría de los estudios realizados *in vitro* demuestran un efecto estimulador de la proliferación y diferenciación osteoblástica, a la vez que inhibe la apoptosis de estos (Vanderschueren et al., 2004). La vía efectora de estos efectos se ha propuesto que es un estímulo de TGF  $\beta$  (Vanderschueren D et al., 2004) e IGF-1 (Rucker D et al., 2004), junto a una inhibición de IL 6. La existencia de un efecto directo de los andrógenos sobre osteoclastos es controvertida, y se ha propuesto que gran parte de los efectos de inhibición osteoclástica están mediados de forma indirecta por la acción sobre osteoblastos (Huber DM et al., 2001). Estas acciones no han sido comprobados *in vivo*.

En varones los andrógenos son responsables de una mayor masa muscular lo que determina mayor tamaño óseo y carga mecánica, aunque se desconoce la trascendencia de este efecto sobre el remodelado. Experiencias en ratones resaltan el principal efecto esquelético de los andrógenos, la regulación del tamaño óseo por potenciación de la aposición de hueso sobre la superficie perióstica externa (Vanderschueren D et al., 2006).

En mujeres el efecto positivo de los andrógenos sobre la DMO queda de manifiesto en una menor masa ósea en aquellas mujeres con síndrome de resistencia a los andrógenos (Marcus R et al., 2000). Otros estudios observacionales han demostrado también esta asociación. En mujeres premenopausicas los niveles de testosterona total y biodisponible muestran asociación con la DMO en cuello femoral (Khosla SF et al., 2005), y parecen ser un buen marcador de predicción de pérdida ósea en dicha localización tras ajustar por edad, peso y niveles de estradiol (Lambrinoudaki I et al., 2006). Los datos en cuanto la asociación entre andrógenos suprarrenales y DMO no son concluyentes, aunque puede que contribuyan a mantener la masa ósea (Haden ST et al., 2000).

La administración de diversos andrógenos tiene efectos positivos sobre la DMO en mujeres postmenopausicas (Davison S et al., 2003), aunque los efectos virilizantes y sobre parámetros metabólicos han impedido su aplicación clínica. En cualquier caso, a pesar de sus efectos positivos sobre la masa ósea los andrógenos en la mujer no desempeñan un papel central en el metabolismo óseo como ocurre con los estrógenos en los varones.

### **B) Factores locales:**

Numerosos factores locales, paracrinos y autocrinos, influyen en el proceso de remodelado. Su origen son las células óseas, células sanguíneas como monocitos y macrófagos, y de la médula ósea. En su regulación intervienen factores sistémicos y hormonales y elementos de la matriz ósea liberados durante el proceso de resorción como los fragmentos de colágeno.

## **Factores de crecimiento y citoquinas:**

### **IGF I y proteínas transportadoras:**

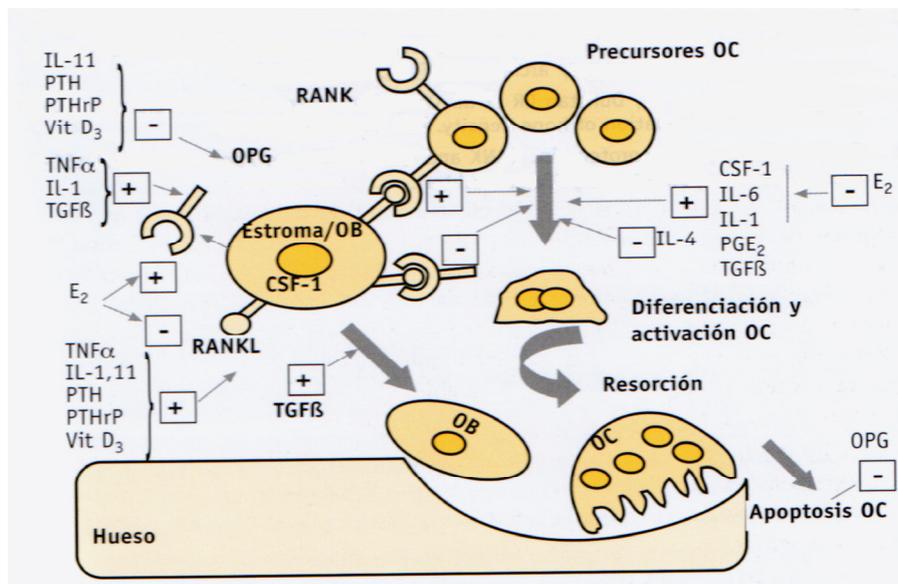
Aunque la secreción máxima de IGF 1 se produce durante la pubertad, en la edad adulta tiene un importante papel en el mantenimiento de la masa ósea. Su origen está en distintos tejidos incluidos el hueso y a pesar de su reconocida importancia sobre la masa ósea su mecanismo de acción no está totalmente aclarado. Estimula la replicación de precursores osteoblásticos, su activación y la síntesis de la matriz y colágeno (Manolagas SC 2000), y ha demostrado inhibir su apoptosis *in vitro* (Farley JR et al., 2001). La IGF 1 se almacena en la matriz y es posible que intervenga en el acoplamiento (Ueland T et al., 2005). Su asociación con la masa ósea de mujeres postmenopáusicas y riesgo de fracturas osteoporóticas ha quedado de manifiesto en diversos estudios (Muñoz Torres M et al., 2001; Garneró P et al., 2000).

Las células óseas producen también los seis tipos de proteínas transportadoras de IGF, IGFBP1-6. Su papel exacto no está claro y entre sus funciones descritas están la de prolongar la vida media de la IGF o el transporte a las células diana. La IGF-BP4 tiene un papel inhibitorio de la replicación y diferenciación de los osteoblastos mientras que la IGF-BP 5 sería estimuladora (Minuto F et al., 2005).

## Interleuquinas:

El receptor activador del factor nuclear kappa B, RANKL, es el factor crítico en las fases más tardías de la diferenciación osteoclástica (Nakamura M et al., 2003). Una vez diferenciados numerosos factores influyen sobre la actividad y supervivencia osteoclásticas: IL 1 es un factor activador de los osteoclastos maduros (Kim JG et al., 2006); IL 3 estimula la diferenciación de precursores a osteoclastos maduros; las IL 4, 13 y 10 inhiben la maduración osteoclastica (Mangashetti LS et al., 2005; Scopes J et al., 2001); IL 6 estimula precursores hematopoyeticos, lo que de forma indirecta estimula la formación osteoclástica (Gorny G et al, 2004). IL 11 estimula la producción de RANKL por los osteoblastos (Ahlen J et al., 2002). IL 12 e IL 18 inhiben la formación de osteoclastos (Roggia C et al., 2004).

Figura 1.9: Efectos e interacciones de los factores paracrinicos con células del microambiente óseo (Gutierrez G, 2004).



### **TGF $\beta$ e INF $\gamma$ :**

TGF  $\beta$  es una de las principales moléculas que intervienen en el proceso de remodelado ya que ejerce acciones sobre osteoblastos y osteoclastos. Inhibe la apoptosis osteoblástica e induce la apoptosis de los osteoclastos, fenómeno que da paso a la fase de formación (Janssens K et al., 2005). Estimula además la síntesis de OPG por lo que se considera una señal crucial entre las células que mantienen el remodelado óseo, y desempeña un importante papel en la reparación de fracturas (Simpson AH et al., 2006).

El INF  $\gamma$  ejerce una potente inhibición de la formación de osteoclastos, a la vez que estimula la síntesis de diversas citocinas entre ellas IL 18 (Takayanagi H et al., 2002).

### **Bone Morphogenetic Proteins (BMPs):**

Son péptidos de la familia del TGF  $\beta$  cuya acción sobre receptores específicos estimula la diferenciación osteoblástica e induce la formación ósea durante el desarrollo esquelético. En el tejido adulto su función es mantener un aporte continuo de osteoblastos, y también se ha demostrado que pueden estimular la resorción ósea (Itoh K et al., 2001). Como característica única induce la diferenciación de células del tejido conectivo a células osteoprogenitoras (Abe E et al., 2000).

## **Oxido nítrico:**

Ha cobrado importancia en los últimos años como regulador del remodelado, ya que es un mediador del efecto anabólico de los estrógenos (Armour KE et al., 2001) y de la respuesta mecánica del hueso (Nomura S et al., 2000). La fuente principal de óxido nítrico en el hueso son los osteoblastos y las células endoteliales. Ejerce también efectos de inhibición osteoclástica (van't Hof RJ et al., 2001).

## **Leptina:**

La leptina es una hormona liberada desde el tejido adiposo con efecto regulador del apetito y de la función reproductora por acción a nivel del sistema nervioso central. En los últimos años ha cobrado importancia su efecto sobre el esqueleto, y se han demostrado receptores para leptina en células mesenquimales preosteoblásticas y osteoblastos maduros (Enjuanes A et al., 2002). Su efecto es anabólico ya que promueve la diferenciación osteoblástica, aumenta la síntesis de proteínas de la matriz y reduce su apoptosis (Gozdeladze JO, 2002). Disminuye también la función osteoclástica por aumento de OPG y descenso de RANKL (Burguera B et al., 2001).

Existe una correlación negativa entre leptina y marcadores de remodelado en mujeres con osteoporosis postmenopáusica (Blain H et al, 2002) y una correlación positiva con la masa ósea (Reid IR, 2004) aunque la causalidad de esta asociación se ve interferida por la relación entre masa grasa, masa ósea y leptina.

## **1.5. Sistema OPG/RANKL.**

### **1.5.1. Descubrimiento y descripción del sistema OPG/RANKL.**

El descubrimiento del sistema OPG-RANKL ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos de señalización entre los principales tipos celulares del tejido óseo, osteoblastos y osteoclastos. En 1997 tres grupos de investigación diferentes descubren la molécula de osteoprotegerina, OPG (Simonet WS et al., 1997; Tsuda E et al., 1997; Yasuda H et al., 1998). Distintos tejidos (sistema cardiovascular, pulmón, intestino, riñón) y tipos celulares (células hematopoyéticas y del sistema inmune) entre ellos los osteoblastos producen OPG, que es secretada como un receptor soluble, mientras que las células dendríticas expresan una forma celular.

El descubrimiento del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) fue posterior al de la OPG. Esta molécula pertenece a la superfamilia de los receptores TNF. Diversos tipos celulares expresan RANKL, entre ellos los osteoblastos, células del estroma, células endoteliales y del sistema inmune. La forma celular es la más abundante, aunque también existe una forma soluble resultado de la excisión de un dominio por una proteasa. La producción es máxima en las células del estroma y disminuye con la maduración hacia fenotipo osteoblástico. Los efectos de RANKL son mediados por RANK, receptor de membrana altamente específico expresado por osteoclastos, células B y T.

Son clásicos ya los estudios en ratones que ayudaron a comprender la función del sistema OPG-RANKL. Los ratones *knockout* para OPG desarrollaban una osteoporosis grave, mientras que la sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos producía osteopetrosis (Tsuda E et al., 1997). La ausencia de RANKL en ratones producía osteopetrosis, alteración de la dentición por ausencia de osteoclastos maduros, ausencia de ganglios linfáticos y deficiencia de linfocitos B y T mientras que la administración de RANKL en su forma soluble se acompañaba de un aumento de la actividad osteoclástica, osteoporosis e hipercalcemia.

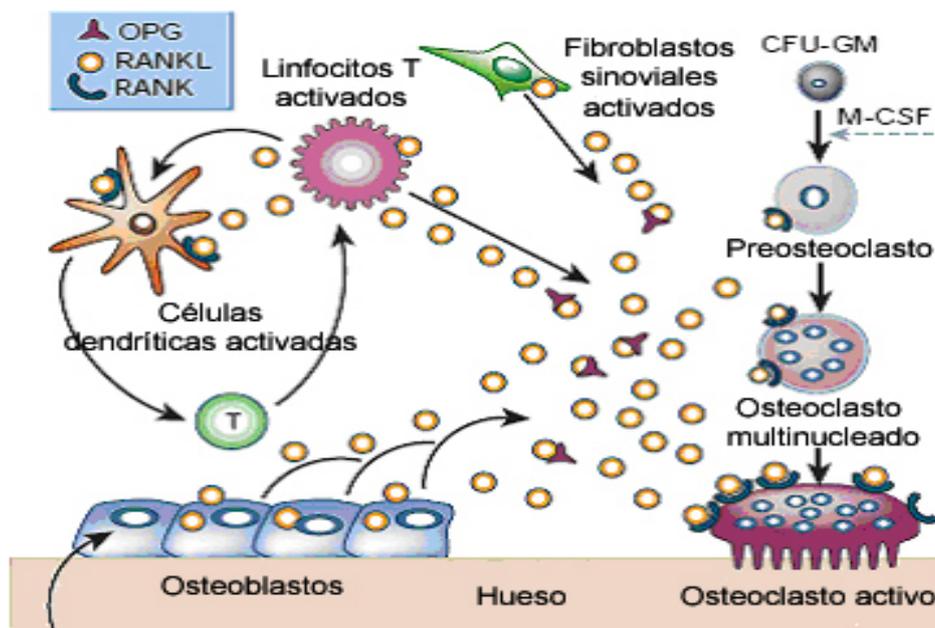
RANKL es el factor crítico para la diferenciación osteoclástica, y en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) se une a RANK y promueve la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos, así como su adherencia a la superficie ósea (Hofbauer LJ et al., 2001). En este proceso de diferenciación también intervienen otras moléculas de la familia de los TNF como TNF $\alpha$  (Kobayashi K et al., 2000) posiblemente favoreciendo la acción de RANKL o estimulando similares vías intracelulares. Las células osteoblásticas también pueden producir M-CSF que facilita la replicación de los precursores osteoclásticos y que puede inducir la expresión de RANK en dichos precursores.

La OPG se une al ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) neutralizando su acción, y de esta manera inhibe la osteoclastogénesis. La cascada de señalización que ocurre tras la unión de RANKL y RANK no se conoce en su totalidad, aunque se sabe que están implicados factores asociados al receptor de TNF y especialmente el 6 (Zaidi M et al., 2003).

Los preosteoblastos y osteoblastos maduros expresan RANKL que se une a RANK expresado en la superficie de los precursores de osteoclastos, y favorece la diferenciación de precursores hacia la formación de osteoclastos maduros. La OPG se une a RANKL neutralizándolo y como resultado inhibe la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica, a la vez que induce la apoptosis de los osteoclastos. La producción de OPG respecto a la de RANKL aumenta con la diferenciación de los osteoblastos, permitiendo que el osteoclasto maduro rellene el espacio de remodelado (Figura 1.10).

Figura 1.10: Acciones OPG y RANKL sobre osteoclastos y células osteoblásticas.

(Adaptado de Boyle WJ 2003).



En osteoblastos la expresión de OPG y RANKL está inversamente regulada (Gori F et al., 2000). Del equilibrio resultante entre la expresión de OPG y RANKL depende la regulación de la diferenciación y activación de los osteoclastos, por lo que constituyen factores reguladores críticos en el metabolismo óseo.

### **1.5.2. Regulación del sistema OPG/RANKL.**

Numerosos factores han demostrado influencia sobre el sistema OPG-RANKL. Datos procedentes de estudios *in vitro* identifican diversos factores humorales y hormonales que afectan a la expresión de estas moléculas. Así mismo se han evaluado los niveles de OPG y RANKL en distintas situaciones tanto fisiológicas como patológicas, y la influencia de algunos tratamientos.

#### **A) Factores humorales:**

Multitud de factores humorales han demostrado tener influencia sobre los niveles de OPG, RANKL o ambos. En general podemos decir que la mayoría de los factores que regulan RANKL afectan inversamente a la síntesis de OPG (Tabla 1.4).

Tabla 1.4: Factores reguladores de OPG y RANKL in vitro:  
(Rogers A et al., 2005).

Factor	OPG	RANKL
1,25 vitamina D	↑	↑
17β estradiol	↑	?
BMP 2	↑	?
Calcio	↑	↑
Inmunosupresores	↓	↑
Glucocorticoides	↓	↑
IL 1	↑	↑
IL 6	?	↑
PG E2	↓	↑
PTH	↑	↓
TGF β	↑	↑
TNF α	↑	↓
VIP	↑	↑

## **B) Situaciones clínicas.**

Los niveles de OPG y RANKL en distintas situaciones tanto fisiológicas como patológicas han sido evaluados, así y la influencia de algunos tratamientos en un intento de contribuir a la fisiopatología de estos procesos (Tabla 1.5).

-

Tabla 1.5: Cambios en OPG/RANKL en diversas situaciones clínicas:  
(Rogers A et al., 2005).

Parámetro	OPG sérica	RANKL sérico
Edad	↑	?
Artritis	↑	↓
Bifosfonatos	↑↔	↔
Terapia estrogénica	↑↓	↓↔
Terapia con glucocorticoides	↓	?
Mieloma múltiple	↓	↑
Enfermedad de Paget	↓	↔
PTH	↓	↑
Paratiroidectomía	↔	?
Fitoestrógenos	↔	↓
Osteoporosis postmenopausica	↑↓	↑↓
Embarazo	↑?	↑?
Cirrosis biliar primaria	↑	↓
Cáncer de próstata	↑	↑
Insuficiencia renal	↑	?

### **Influencia de edad y sexo.**

Distintos autores han demostrado una asociación positiva entre los niveles de OPG y la edad, tanto en varones como en mujeres (Koshla S et al., 2002; Kudlacek S et al., 2003; Oh KW et al., 2004) con resultados discordantes en cuanto a la relación entre OPG y niveles de hormonas sexuales.

Así, Koshla y colaboradores demuestran niveles superiores en mujeres premenopausicas respecto a varones con una edad inferior a 50 años, sin diferencias entre postmenopausicas y varones mayores de 50 años. Los niveles séricos de OPG se correlacionaron con los de testosterona en varones, sin hallar correlación con estrógenos o testosterona en mujeres.

En otro estudio se ha demostrado una asociación positiva débil entre OPG y testosterona y estradiol libres en suero, pero solo tras ajustar por edad e IMC (Szulc P et al., 2001). Kudlacek y cols también describen una asociación positiva entre OPG y edad en ambos sexos aunque fijan un umbral de edad para este hecho, que corresponde a 60 años para mujeres y 70 en varones. Los niveles de OPG y estradiol se relacionaron de forma positiva solo en mujeres. Otros autores confirman la relación entre edad y OPG, aunque consideran otro dintel de edad a partir del cual se produce la elevación de OPG (Trofimov S et al., 2004).

### **1.5.3. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades óseas y extraóseas.**

Se ha comprobado la existencia de niveles séricos elevados de OPG, RANKL o alteraciones de su cociente en múltiples trastornos esqueléticos. También ha sido objeto de estudio los cambios inducidos por distintos tratamientos con efecto sobre el hueso en el sistema OPG –RANKL.

En el caso de la polimialgia reumática y la artrosis existe un aumento de RANKL sin cambios aparentes en OPG (Pulsatelli L et al., 2004), independiente de la edad, y que según los autores explica el aumento de remodelado que ocurre en ambas enfermedades. En la enfermedad de Paget existe un aumento de los niveles de OPG, sin relación con otros marcadores de actividad de la enfermedad (Alvárez L et al., 2003).

Es bien conocida la repercusión del hipertiroidismo sobre la DMO, ya que produce una elevación marcada de marcadores de remodelado, y es uno de los factores de riesgo reconocidos de osteoporosis. En pacientes con hipertiroidismo los niveles de OPG están significativamente elevados respecto a eutiroideos, y el tratamiento médico normaliza la elevación de OPG de manera paralela al descenso de marcadores de remodelado (Amato G et al., 2004), a pesar de la persistencia de una anormal estructura ósea comprobada por ultrasonografía. En el caso de los pacientes con enfermedad de Graves los niveles basales de OPG fueron superiores y se mantuvieron elevados un tiempo superior al necesario para el control de la función tiroidea, mientras que los pacientes con bocio nodular tóxico experimentaron una reducción precoz de OPG tras el tratamiento.

En pacientes con hipotiroidismo los niveles de OPG se encuentran elevados, y descienden con el tratamiento sustitutivo con hormona tiroidea (Nagasaki T et al., 2005). Recientemente se ha descrito relación entre el descenso de OPG y la vasodilatación arterial dependiente del endotelio, lo que podría constituir uno de los mecanismos implicados en la alteración vascular de los pacientes con hipotiroidismo (Guang-Da X et al., 2005).

Tras el trasplante cardíaco y bajo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A y corticoides, el descenso de OPG muestra una alta correlación con la pérdida de masa ósea a nivel lumbar que ocurre precozmente, por lo que los cambios en OPG inducidos por el tratamiento pudieran ser determinantes en la osteoporosis postrasplante (Fahrleitner A et al., 2003).

## **Artritis reumatoide.**

En pacientes con artritis reumatoide los niveles séricos de OPG y RANKL están elevados respecto a controles, sin alteraciones del ratio OPG/RANKL. Los niveles se normalizan tras el tratamiento con anti-TNF alfa (Ziolkowska M et al., 2002). En el líquido sinovial los niveles de OPG son bajos, lo que supone un aumento del ratio RANKL/OPG que contribuye a la destrucción articular según algunos autores (Skoumal M et al., 2004), mientras que otros encuentran un aumento del ratio OPG/RANKL en tejido sinovial como consecuencia de elevación de OPG, y proponen un mecanismo protector (Vanderborgh A et al., 2004).

## **Neoplasias.**

Brown y colaboradores han demostrado in vitro que las células de cáncer de próstata procedentes de metástasis óseas presentan una mayor expresión de OPG y RANKL que las células metastásicas de otras localizaciones. El mismo grupo ha constatado niveles significativamente mayores de OPG en pacientes con neoplasia de próstata diseminada frente a hiperplasia benigna y neoplasia localizada, lo que sugiere un potencial papel de la OPG como marcador de progresión de enfermedad.

En pacientes recientemente diagnosticados de mieloma múltiple existe un aumento de los niveles de RANKL relacionado con el grado de afectación, marcadores de resorción y actividad de la enfermedad. En la gammapatía monoclonal de significado incierto existe por el contrario un aumento de

OPG con un descenso del ratio RANKL/OPG, lo que podría permitir el diagnóstico diferencial de estas patologías (Politou M et al., 2004).

### **Osteoporosis postmenopáusica.**

El papel del sistema OPG/RANKL en la osteoporosis postmenopáusica ha sido investigado desde el descubrimiento de este sistema, aunque los estudios realizados han mostrado resultados contradictorios.

En cuanto a la asociación entre OPG y masa ósea, Browner y Khosla no encuentran asociación en mujeres postmenopausicas (Browner WS et al., 2001; Khosla S et al., 2002). Otros autores demuestran una correlación negativa entre OPG y DMO solo en trocánter (Kudlacek S et al., 2004) o proponen niveles elevados de OPG como indicador de una mayor masa ósea (Rogers A et al., 2000).

Los resultados de los estudios que han analizado su relación con la presencia de osteoporosis también difieren. Los resultados de algunos de estos estudios muestran niveles mayores de OPG en mujeres con osteoporosis respecto a controles, y valores más elevados en aquellas mujeres con un nivel de remodelado superior. (Grigorie D 2003). Otros autores demuestran niveles inferiores a la media de la población estudiada en aquellas pacientes con criterios densitométricos de osteoporosis (Mezquita-Raya P et al., 2005).

Se ha propuesto que los niveles elevados de OPG podrían ser un mecanismo compensador frente al aumento de la actividad osteoclástica característico de la osteoporosis, aunque esta hipótesis no está totalmente aceptada.

Respecto a la asociación de OPG y fracturas osteoporóticas, Mezquita-Raya y cols encuentran que niveles bajos de OPG se asocian de forma positiva e independiente con la presencia de fractura vertebral mientras que otros autores no encuentran asociación entre OPG y fracturas asociadas a la osteoporosis (Browner WS et al., 2001).

### **Enfermedad vascular.**

En los últimos años han sido publicados varios artículos que destacan el papel del sistema OPG-RANKL en desórdenes que afectan al sistema vascular. La OPG ha demostrado ser un factor autocrino que favorece la supervivencia de células endoteliales (Pritzker LB et al., 2000).

Existe una correlación positiva entre los niveles séricos de OPG y conocidos factores de riesgo cardiovascular, como la circunferencia de la cintura, y el colesterol total y su fracción LDL (Sook E et al., 2005).

Se ha postulado que la OPG pueda constituir un marcador bioquímico de la demencia vascular y de la enfermedad arterial periférica ya que los pacientes con afectación más severa y úlceras arteriales presentaron niveles más elevados de OPG (Ziegler S et al., 2005).

Durante la fase precoz tras un infarto agudo de miocardio niveles más altos de OPG se asocian a un peor pronóstico (Ueland T et al., 2004), relación que se mantuvo en los primeros meses de seguimiento y que hace sugerir a los autores que pueda ser un marcador no invasivo de riesgo.

En pacientes con diabetes tipo 2 niveles elevados de OPG se correlacionan con la presencia de complicaciones microvasculares y los niveles de Hb A1C (Knudsen ST et al., 2003). Los niveles de OPG estaban elevados solo en aquellos pacientes con DM 2 que presentaban microalbuminuria, lo que excluye la presencia de diabetes como causa de la elevación.

También se han descrito niveles altos de OPG en pacientes con DM 2 y cardiopatía isquémica asintomática (Avignon A et al., 2005), y asociación con el grado de severidad de la cardiopatía isquémica, tanto en diabéticos como en no diabéticos (Jono S et al., 2002).

Al igual que en el campo de las enfermedades óseas no está claro el papel del sistema OPG-RANKL en la enfermedad vascular, ya que pudiera ser un mecanismo patogénico en sí mismo o un mecanismo compensador para reparar el daño vascular. El papel del sistema OPG-RANKL en el sistema vascular podría explicar la frecuente asociación que existe entre osteoporosis y aterosclerosis en personas de edad.

## **1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado.**

La caracterización de los componentes celulares y extracelulares de la matriz esquelética ha permitido el desarrollo de marcadores bioquímicos que reflejan de forma específica los procesos de formación y resorción. Los marcadores de remodelado incluyen enzimas y péptidos no enzimáticos, y se clasifican en función de la fase que representan, aunque algunos pueden ser reflejo tanto de la fase de formación como de la resorción debido al fenómeno de acoplamiento (Tabla 1.6).

Los marcadores de remodelado constituyen un método diagnóstico incruento y su correcto uso puede ser una herramienta útil en la valoración y monitorización de la osteoporosis.

Tabla 1.6: Marcadores de remodelado más frecuentemente usados en la clínica.

<b>Marcadores de formación:</b>	<b>Marcadores de resorción:</b>
Fosfatasa alcalina total	Piridolina y Deoxipiridolina (PYD, DPD)
Fosfatasa alcalina ósea (BSAP)	Telopéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno tipo I (CTX, NTX)
Osteocalcina (OC)	Fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP)
Propéptidos amino y carboxi terminales del procolágeno tipo I (PICP, PINP)	

### **1.6.1. Utilidad de los marcadores de remodelado en osteoporosis postmenopáusica.**

La utilidad de la determinación de marcadores de remodelado en el campo de la osteoporosis postmenopáusica es controvertida. Los datos existentes reflejan una mayor tasa de pérdida ósea y de fracturas en pacientes con alto remodelado, pero estos resultados proceden de estudios poblacionales y en muchos casos retrospectivos y no está clara su aplicación en la práctica clínica diaria y en la valoración de un paciente individual.

#### **1.6.1.1. Predicción de masa ósea.**

Numerosos estudios han analizado la capacidad de los marcadores para predecir que pacientes tendrán una pérdida ósea acelerada que les predisponga al desarrollo de osteoporosis (Garnero P et al., 2000; Ross PD et al., 2000). Generalmente existe una correlación negativa entre la masa ósea y la tasa de resorción y formación, pero esta asociación no es suficiente para poder predecir la masa ósea de un individuo determinado. La correlación es mayor para marcadores de resorción, aunque este grado de asociación es menor cuando se calcula para una localización concreta (Johnell O et al., 2002).

Estudios ya clásicos demostraron que la combinación de niveles elevados de CTX y baja DMO suponía un riesgo relativo de fractura de cadera de 4.8 en mujeres ancianas (Garnero P et al., 1996). Igual combinación en mujeres mayores de 65 años aumentaba el riesgo de presentar cualquier fractura 4.2

veces (Garnero P et al., 2000). Un estudio reciente de Garnero y colaboradores ha evaluado de forma prospectiva cambios en DMO en antebrazo en mujeres en la postmenopausia temprana. Aquellas mujeres que presentaban valores de recambio alto (por encima de 2 desviaciones estandar) perdieron entre 3 y 5 veces más masa ósea que aquellas con valores normales (Garnero P et al., 2002). Se han publicado resultados similares con otras combinaciones de marcadores y para distintas localizaciones (Delmas PD et al., 2000).

Otros estudios no encuentran relación entre las tasas de recambio y los cambios en DMO si bien esta discordancia puede explicarse por un seguimiento corto o porque el marcador elegido no refleje adecuadamente la fase de resorción (Garnero P et al., 2000).

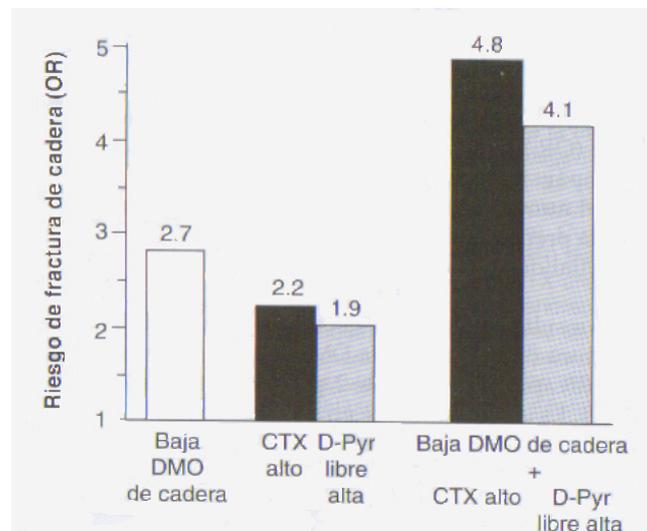
### **1.6.1.2. Predicción del riesgo de fractura.**

Estudios prospectivos han demostrado una asociación entre la presencia de fracturas osteoporóticas y niveles elevados de marcadores de remodelado, independientemente de la DMO, tanto en mujeres en el momento de la menopausia como en mujeres ancianas (Garnero et al., 1996; Johnell O 2002). En el caso de las mujeres ancianas el riesgo de fractura fue del doble en aquellas con niveles de marcadores por encima del rango de referencia de mujeres premenopausicas tras ajustar por DMO.

Según Garnero y cols el riesgo de fractura era 1.4 veces mayor por cada DE que aumentaban los valores de deoxipiridolina, y 1.3 veces para CTX; la combinación de niveles altos de CTX y una baja masa ósea suponía una

odds ratio de 4.8 para fractura de cadera. Existen resultados similares para otros marcadores.

Figura 1.11: Combinación de DMO y tasas de resorción para predicción de fractura de cadera. (Garnero et al., 1996)



De nuevo estas asociaciones se han demostrado para grandes grupos de población, y no se han comprobado en pacientes individuales. Algunos autores sugieren que en caso de no ser posible la realización de DXA, la combinación de historia previa de fractura por fragilidad con un nivel elevado de CTX urinario podría predecir el riesgo de fractura de cadera con igual comportamiento a la DMO (Garnero et al., 2002).

### **1.6.1.3. Predicción de respuesta al tratamiento.**

Los diferentes tratamientos antirresortivos producen un descenso precoz de los marcadores de resorción, que ocurre entre 1 y 3 meses tras iniciar el tratamiento. El cambio en los marcadores de formación ocurre más tarde, entre 3 y 6 meses. Se ha investigado la relación entre los cambios inducidos en marcadores por diversos tratamientos, cambios en DMO y fracturas, tratando de predecir la respuesta de masa ósea tras el tratamiento en función de los valores de marcadores a los 3 y 6 meses.

En un estudio prospectivo de mujeres con osteoporosis postmenopausica que iniciaron tratamiento con alendronato los cambios en NTX y osteocalcina a los 6 meses de tratamiento se correlacionaron con los cambios en masa ósea a los dos años, con una mayor correlación para NTX. Los autores concluyen que en un paciente individual el descenso de marcadores a los seis meses de tratamiento por debajo de un determinado umbral es predictor de respuesta positiva a dicho tratamiento, sin embargo un descenso menor de marcadores no identifica aquellas pacientes no respondedoras y que perderán masa ósea a pesar del tratamiento (Greenspan SL et al., 2000).

Los marcadores de remodelado presentan una serie de inconvenientes que dificultan su uso en la práctica clínica. Entre estas limitaciones se encuentran su variabilidad biológica y analítica, su origen en diversos tejidos lo cual supone una baja especificidad, y el solapamiento que existe entre los valores obtenidos en población sana y enferma.

Esto hace que actualmente no se recomiende el uso de marcadores en el diagnóstico de osteoporosis, quedando limitados al campo de la investigación. Pueden ser de utilidad en el seguimiento de la adherencia en pacientes en tratamiento con bifosfonatos, y recientemente algunos expertos proponen determinar marcadores de remodelado en pacientes en tratamiento con alendronato a los que se suspende el tratamiento a fin de valorar el riesgo de fractura y la conveniencia de reiniciar el tratamiento (Delmas P, ASMBR 2005).

### **1.6.2. Relación entre marcadores de remodelado y OPG.**

Los resultados en cuanto a la relación existente entre marcadores de remodelado y OPG, tanto en osteoporosis postmenopáusica como en procesos diferentes a ésta, son discordantes. Algunos estudios no encuentran relación (Koshla S et al., 2002; Mezquita Raya P et al., 2005), mientras que otros muestran correlaciones negativas con marcadores de formación como la osteocalcina (Browner WS et al., 2001), fosfatasa alcalina ósea (Rogers A et al., 2002) y deoxipiridolina urinaria (Szulc P et al., 2001). A esta discordancia pueden contribuir la variabilidad propia de los marcadores de remodelado y el pequeño tamaño de la muestra de algunos de estos estudios. En pacientes tratadas con GnRH los niveles de OPG se correlacionaron positivamente con marcadores de formación (Uemura H et al., 2003), al igual que en un grupo de pacientes premenopausicas sanas (Oh KH et al., 2004).

## **1.7. Catepsina K y resorción ósea.**

La falta de especificidad de los marcadores de remodelado clásicos hace que la identificación de marcadores específicos de la actividad de los osteoclastos pueda ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis y otras enfermedades metabólicas óseas.

La catepsina K es una colagenasa expresada de forma específica en los osteoclastos, a diferencia de otras formas de catepsina con distribución en varios tejidos (Rieman DJ et al., 2001). Fue descubierta en 1994 a partir del análisis de osteoclastos y macrófagos de cultivos de ratón, y posteriormente se clonó la enzima humana (Tezuka K et al., 1994). Constituye la enzima proteolítica más abundante del osteoclasto, y su función es degradar el colágeno tipo I en las regiones helicoidal y telopeptídica tanto a pH ácido como neutro (Garnero P et al., 1998). También actúa sobre el colágeno tipo II presente en la sinovial por lo que podría tener su papel en la patogenia de enfermedades que cursan con destrucción del cartílago como la artritis reumatoide (Hou WH et al., 2003).

Su papel fundamental para un correcto remodelado queda demostrado por los siguientes hechos: los ratones *knock out* para catepsina K sufren una severa osteoesclerosis (Kiviranta R et al., 2001), y en humanos la mutación del gen de la catepsina K ocasiona la pycnodisostosis, displasia ósea de transmisión autonómica recesiva que cursa con osteoesclerosis, baja estatura y fragilidad ósea (Fratzl-Zelman N et al., 2004). La delección del gen de la catepsina K en ratones reduce la progresión de la placa de ateroma induciendo fibrosis, y en humanos se ha comprobado la existencia

de niveles elevados de catepsina K en placas de ateroma estables respecto a aquellas que presentaban trombosis (Lutgens E et al., 2006).

Se han demostrado niveles séricos elevados de catepsina K en pacientes con artritis reumatoide y correlación con el grado de destrucción radiológica (Skoumal M et al., 2004). En un estudio que incluyó pacientes con DMO normal, osteopenia y osteoporosis postmenopausica, las concentraciones séricas de catepsina K fueron mayores en los pacientes con osteoporosis respecto a los que tenían osteopenia o una masa ósea normal. Así mismo concentraciones altas de catepsina K se asociaron a presencia de fracturas osteoporóticas múltiples, sin diferencias entre pacientes con fractura única y pacientes sin fracturas por lo que los autores sugieren que los niveles de catepsina K podrían ser predictores de la presencia de osteoporosis y fracturas (Holzer G et al., 2005). Otros autores también han comprobado niveles elevados de catepsina K en pacientes con osteoporosis postmenopausica comparados con postmenopausicas sin osteoporosis y pacientes con enfermedad de Paget (Meier C, 2006).

Estudios recientes realizados en animales destacan el posible papel de la catepsina K como uno de los factores de diferenciación de adipocitos y en consecuencia en la patogenia de la obesidad (Xiao Y et al., 2006). También se ha demostrado inmunorreactividad para catepsina K en osteoblastos y osteocitos, aunque se desconoce su papel fisiopatológico y aún no se ha demostrado que contribuyan a los niveles circulantes de esta proteasa (Mandelin J et al., 2005).

## **1.8. Tratamiento de la osteoporosis postmenopausica con antirresortivos: resultados con alendronato.**

Los bifosfonatos, análogos estables del pirofosfato, son potentes inhibidores de la resorción. Producen un descenso del desarrollo de precursores de osteoclastos y su reclutamiento, y promueven la apoptosis de osteoclastos maduros, disminuyendo la tasa de remodelado (Papapoulos, 2006). El resultado de sus acciones es un descenso de la velocidad de activación de nuevas unidades de remodelado y una disminución de la cantidad de hueso resorbida en cada unidad, lo que a su vez permite un mayor grado de mineralización. También se ha comprobado in vitro efectos antiapoptóticos sobre los osteoblastos y osteocitos (Plotkin L, 2001), y recientemente se han descrito efectos sobre la angiogénesis y linfocitos T (Bukowski JF et al., 2005) lo que podría influir en una menor supervivencia de los osteoclastos.

Los aminobifosfonatos, grupo que incluye a alendronato, risedronato ibandronato y zoledronato, son los de acción más potente. De entre ellos alendronato es el que dispone de un mayor número de estudios que incluyeron a un gran número de pacientes.

El Fracture Intervention Trial (FIT) examinó el efecto de alendronato sobre la incidencia de nuevas fracturas en mujeres con osteoporosis postmenopausica. Tanto en el grupo con fractura vertebral previa como en el que no presentaba fracturas, alendronato produjo una reducción del riesgo de fractura vertebral radiológica del 48 %, de fractura vertebral

clínica del 59% y de fractura vertebral múltiple del 90%. La reducción del riesgo de fractura de cadera fue del 53 %, y del 30% para todas las fracturas clínicas. Estos efectos fueron demostrables a los 12 meses de tratamiento y a los 18 meses para fractura de cadera (Black DM et al, 2000). El tratamiento con alendronato en mujeres con osteoporosis postmenopausica induce un importante descenso de los marcadores de remodelado, que se demuestra a los 3 meses de tratamiento. Esta reducción es del 75 % para NTX urinario, y del 55% para fosfatasa alcalina ósea (Sambrook PN et al, 2004).

Una extensión de dicho estudio evaluó a un grupo de mujeres hasta completar 5 años de seguimiento. Los marcadores de remodelado se redujeron a niveles de premenopausia a los 6 meses de tratamiento manteniendose estables durante los 5 años de seguimiento. A nivel de DMO se produjo un incremento en columna lumbar, cuello femoral y trocánter femoral de 9.4, 4.8 y 9.1% respectivamente. (Favus M et al, 1997). Posteriormente se realizó una extensión adicional de 2 años, cuyo resultado fue un aumento progresivo de la DMO en columna lumbar hasta 11.4% respecto a valores basales. En el análisis de regresión lineal se comprobó que cada año adicional de tratamiento aumentaba la DMO en columna lumbar del 0.83%. En ese mismo estudio se evaluó el efecto de la discontinuación de alendronato sobre la DMO y los niveles de marcadores de remodelado, y aunque no se observaron cambios significativos en los valores de DMO en columna y cadera, si se objetivó un ligero descenso en extremidad distal del radio y cuerpo total. Tras la suspensión del tratamiento los niveles de marcadores aumentaron ligeramente aunque no se observaron cambios en la incidencia de fracturas (Tonino R et al., 2000).

Una tercera extensión del seguimiento hasta 10 años muestra un aumento progresivo de la DMO hasta 13.7 % en columna lumbar, 10.3 % en trocánter, 5.4 % en cuello femoral y 6.7% en cadera total. El efecto sobre reducción de marcadores también se mantuvo, por lo que los autores concluyen que la administración de alendronato por un periodo de 10 años es seguro y produce un beneficio mantenido en términos de DMO y reducción de fracturas (Bone HG et al., 2004).

Algunos autores han estudiado si los cambios iniciales en marcadores predicen la respuesta al tratamiento con alendronato. Greenspan y cols siguieron a un grupo de mujeres con una edad media de 70 años, y comprobaron que la reducción de NTX y CTX inducida por alendronato a los 6 meses se correlacionó con los cambios en DMO en columna lumbar a los 2 años y medio de tratamiento, aunque no existió correlación entre los niveles basales de marcadores y la DMO basal.

Un estudio que evaluó la utilidad de diferentes marcadores de remodelado para identificar aquellas mujeres postmenopausicas con un alto índice de remodelado y la capacidad para predecir los cambios en DMO en aquellas con osteoporosis que iniciaron tratamiento con alendronato, concluye que CTX en suero es el más eficiente a pesar de su mayor variabilidad teórica frente a otros marcadores como fosfatasa alcalina ósea (Fink E et al., 2000).

## **1.9. Cambios en OPG/RANKL y catepsina K en pacientes tratados con bifosfonatos.**

Hasta el momento, los estudios disponibles sobre el efecto del tratamiento con bifosfonatos sobre el sistema OPG-RANKL son contradictorios y no concluyentes. En estudios realizados *in vitro* sobre cultivos celulares animales diferentes concentraciones de pamidronato y alendronato no produjeron cambios en la expresión de RNAm de OPG y RANKL a pesar de inducir una inhibición de la actividad osteoclástica (Kim YH et al., 2002). En otro ensayo sobre osteoblastos humanos pamidronato y ácido zoledrónico si estimularon la producción de OPG. (Viereck V et al., 2002; Beiqing P et al., 2004).

Los pocos estudios realizados *in vivo* hasta ahora también difieren en sus resultados. En pacientes con artritis reumatoide, el tratamiento con etidronato no tuvo efecto sobre los niveles de OPG, a pesar de producir una reducción del remodelado (Valleala H et al., 2003). En pacientes con beta talasemia tratados con pamidronato los niveles de OPG mostraron un descenso significativo con el tratamiento (Voskaridou E et al., 2004). Ibandronato tampoco muestra efectos sobre OPG o RANKL en pacientes con hipercalcemia tumoral (Zojer N et al., 2005).

En la enfermedad de Paget, existe una elevación basal de la OPG sérica que se reduce tras el tratamiento con tiludronato (Alvarez L et al., 2003). Por el contrario, el tratamiento con risedronato produce una elevación de OPG de forma inversa al descenso de la fosfatasa alcalina total (Mosseti G et al.,

2005). Esta diferencia puede ser explicada por la diferente vía metabólica de actuación de ambos fármacos.

En osteoporosis postmenopáusica solo un estudio ha evaluado los cambios en OPG y RANKL en pacientes que reciben tratamiento con aminobifosfonatos. Los resultados de este estudio muestran un aumento de los niveles de OPG tanto en el grupo tratado con risedronato como en el de alendronato, con una correlación positiva entre el aumento de OPG y los cambios positivos en masa ósea (Dobnig H et al., 2005).

Son escasos los datos acerca del efecto de la administración de bifosfonatos sobre los niveles de catepsina K. En un grupo de 18 pacientes tratados con bifosfonatos orales, las concentraciones de catepsina K descendieron de forma no significativa (Holzer G et al., 2005). La administración de bifosfonatos orales o intravenosos tanto en pacientes con osteoporosis postmenopausica como en enfermedad de Paget ocasionó una reducción de los valores de catepsina K, que en el grupo de osteoporosis postmenopausica fue del 33% al mes de tratamiento (Meier C et al., 2005).



## **2. Objetivos.**



## **2. OBJETIVOS:**

**OBJETIVO GENERAL:** Evaluar el efecto de la administración de alendronato (70 mg/semana) durante un año sobre marcadores de metabolismo óseo en mujeres con osteoporosis postmenopausica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

-Analizar las modificaciones inducidas por el tratamiento sobre los valores de masa ósea, 25 OH vitamina D y marcadores de remodelado.

-Determinar el papel de catepsina K como marcador de metabolismo óseo en mujeres con osteoporosis postmenopausica tratadas con alendronato.

-Evaluar los cambios en las concentraciones séricas de OPG y RANKL total en esta población.



### **3. Material y Métodos.**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **3.1. Población de estudio.**

Pacientes remitidas para cribado de osteoporosis a la Unidad de Metabolismo Óseo del Servicio de Endocrinología y Nutrición Clínica (Hospital Universitario San Cecilio de Granada). El estudio se realizó entre julio de 2003 y febrero de 2004.

Se incluyeron en el estudio a 51 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Cinco pacientes no completaron el año de seguimiento (tres por intolerancia al fármaco, una por decisión propia y otra por imposibilidad de seguimiento) por lo que el tamaño muestral ha sido de 46.

#### **Criterios de inclusión:**

- Aceptación de consentimiento informado.
- Mujeres de raza caucásica.
- Estatus menopáusico: confirmado mediante la constatación de al menos un año desde la última menstruación y la determinación de los niveles séricos de estradiol y gonadotrofinas.
- Régimen de vida ambulatorio.
- Presencia de criterios densitométricos de osteoporosis (T-Score en columna lumbar y/o cuello femoral inferior a -2.5 desviaciones estándar).

### **Criterios de exclusión :**

- Antecedentes de patología metabólica ósea, exceptuando la osteoporosis: comprobado mediante la historia clínica, exploración y estudio analítico.
- Antecedentes de enfermedad hepática, renal, tiroidea u otras causas secundarias de osteoporosis: comprobado mediante exploración general y estudio analítico (determinaciones séricas de calcio, fósforo, creatinina, urea, tiotropina y función hepática dentro de la normalidad).
- Antecedentes de tratamiento con fármacos antiresortivos, tiazidas, esteroides u otras terapias que pudieran afectar al metabolismo óseo: comprobado mediante la historia clínica.

Las pacientes fueron tratadas con alendronato 70 mg/semana junto a suplementos de calcio y vitamina D (1200 mg y 800 UI al día respectivamente). Los fármacos se tomaron siguiendo las indicaciones de la ficha técnica.

### **3.2. Diseño del estudio.**

El diseño del estudio corresponde a un estudio de cohortes prospectivo. El protocolo de estudio ha incluido para todos los sujetos:

- Historia clínica, encuesta nutricional, exploración física, bioquímica básica y función tiroidea en la visita basal.
- Determinaciones bioquímicas en las visitas basal, 3, 6 y 12 meses.
- Determinación de densidad mineral ósea: visitas basal y 12 meses.
- Estudio de radiología vertebral: basal y 12 meses.

La determinación de factores de riesgo e ingesta cálcica al inicio del estudio clasificó a los pacientes según:

-Hábito tabáquico: se distinguieron tres grupos: no fumadoras, consumo inferior a 20 cigarros día, y consumo superior a 20 cigarros día.

-Hábito alcohólico: resultando tres grupos: no consumo de alcohol, consumo inferior a 40 gramos de alcohol al día, y consumo superior a 40 gramos.

-Consumo de café: se distinguieron tres grupos: no consumo, ingesta diaria inferior a 2 tazas y consumo habitual superior a 2 tazas.

-Actividad física: se diferenciaron 3 categorías: actividad sedentaria, moderada e intensa.

-Ingesta cálcica diaria: se estimó a partir de una encuesta nutricional que valora la frecuencia de consumo de varios productos, principalmente lácteos (Fernandez Lloret S et al., 1997).

### **3.3. Determinaciones hormonales, marcadores de remodelado y osteoclastogénesis.**

#### **3.3.1. Determinaciones hormonales.**

Gonadotropinas: los valores de LH y FSH se obtuvieron a través de un test inmunológico de electroquimioluminiscencia que usa anticuerpos monoclonales específicos para ambas hormonas. Su lectura se realiza en el analizador automático Roche Elecsys 1010/2010. El coeficiente de variación intraensayo es inferior al 2%, y el total entre el 2 y el 5%.

Hormona paratiroidea intacta (PTH-i): determinada por el kit Intact PTH suministrado por DiaSorin (Stillwater, Minnesota, USA) que se basa en la utilización de dos anticuerpos policlonales con afinidad específica para la molécula de PTH intacta, el primero para la región 39-84 y el segundo para la 1-34 etiquetado con I125. Los valores de referencia se encuentran entre 13 y 54 pg/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo están en torno al 3%.

25-hidroxivitamina D (25OHD): su valoración se realiza mediante el kit 25-Hydroxyvitamin D 125I RIA suministrado por DiaSorin (Stillwater, Minnesota, USA). En la determinación de la 25OHD se realizan dos pasos: primero se realiza una rápida extracción del suero o plasma de la 25-OH-Vitamina D y otros metabolitos hidroxilados mediante acetonitrilo y posteriormente se utiliza un método de radioinmunoanálisis para la determinación de la 25-OH-vitamina D.

El rango de normalidad que proporciona el kit es entre 9 y 37 ng/ml, aunque recientes estudios indican la conveniencia de considerar otros valores de normalidad. Los coeficientes de variación intra e interensayo son 10.5 y 8.2 % (Mezquita Raya P et al., 2001).

*Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I):* para su determinación se ha empleado el kit IGF-1 I125 RIA, suministrado por DiaSorin (Stillwater, Minnesota, USA). En esta técnica como estándar se utiliza IGF-1 humana obtenida por ingeniería genética y como trazador IGF-1 marcada con I125 que compite con la IGF-1 problema. Como antisuero se utiliza anti-IGF-1 de conejo, que reconoce la IGF-1 humana de forma homóloga. El nivel mínimo de detección del ensayo fue 10 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores al 6%. Los valores de normalidad en adultos entre 40 y 54 años son de 90 a 360 ng/ml y en adultos de más de 55 años son de 71 a 290 ng/ml (Muñoz-Torres ME et al., 2001).

*Estradiol ultrasensible:* para su determinación se ha usado el kit DSL-39100 3rd Generation Estradiol RIA suministrado por VITRO que se basa en el uso de estradiol marcado con I125, antisuero de conejo paraestradiol y gammaglobulina de cabra unida a etilenglicol como reactivo de precipitación. Los valores de referencia para mujeres postmenopáusicas se encuentran entre 12 y 51 pg/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo son inferiores al 4%.

### **3.3.2. Marcadores de remodelado óseo.**

#### **3.3.2.1. Formación ósea.**

Actividad de fosfatasa alcalina (tALP): se aplicó un método cinético-colorimétrico basado en la formación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenilfosfato, a través de una reacción química catalizada por las fosfatasas alcalinas en medio alcalino. Se empleó el autoanalizador Hitachi 704 Boehringer Mannheim GmbH. Los valores de referencia se sitúan entre 40 Y 130 UI/L.

Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (bALP): se determinó mediante ensayo inmunoradiométrico sobre fase sólida con doble anticuerpo monoclonal dirigido contra la misma molécula de fosfatasa alcalina esquelética (técnica de sandwich) con un kit comercial de Hybritech Europe, Liege (Belgica) (Tandem-R Ostase™). Los valores normales (media±DE) son 7.5-33.7 ug/ml para mujeres postmenopausicas. La precisión intraensayo es del 4.2% (coeficiente de variación) y la interensayo 7.2%.

Osteocalcina (OC): su valoración se realizó mediante un kit de radioinmunoensayo suministrado por DiaSorin (Stillwater, Minnesota, USA), que utiliza como estándar y trazador BGP bovina, y como antisuero anti-BGP bovina de conejo, cuyos límites de normalidad son 1,8 y 6,6 ng/ml. La media de los valores de referencia proporcionados por la casa comercial oscilan entre 1.8-6.6 ng/ml. La precisión intraensayo es del 5.3% (CV) y la interensayo del 8.6%.

### **3.3.2.2. Resorción ósea.**

Actividad de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP): sus niveles se determinaron por un proceso enzimático-colorimétrico a partir del método de Hilmann mediante el autoanalizador Hitachi 704 Boehringer Mannheim GmbH. Los valores normales oscilan entre 1.5 y 3 UI/l.

Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I ( CTX) en suero : su medición se realizó con el kit Elecsys  $\beta$  CrossLaps(Roche Diagnostics SL, Barcelona, España), que es un ensayo tipo sandwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales específicos para el  $\beta$  isómero del extremo C terminal del telopéptido del colágeno tipo I. El ensayo se realizó con el analizador automático Elecsys 2010 (Roche Diagnostics). El intervalo de medición oscila entre 0.01 y 6 ng/ml, con una variabilidad intra e interensayo inferior al 6% (Okabe R et al., 2001) . Las cifras de normalidad para mujeres postmenopausicas oscilan entre 0,2 y 0,6 ng/ml.

Catepsina K: sus valores se han determinado mediante el kit Cathepsin K ELISA BI-20432, suministrado por Biomedica Gruppe, y que se basa en la utilización de anticuerpos policlonales. El rango de determinación es 0-300 pmol/l, y el límite de determinación 1.1 pmol/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo son 4 y 6% respectivamente (Holzer G et al., 2005).

### **3.3.3. Estudio de marcadores de osteoclastogénesis.**

Osteoprotegerina: la determinación cuantitativa de OPG se ha realizado mediante el kit osteoprotegerin OPG ELISA BI-20402 suministrado por Immundiagnostic (Bensheim, Deutschland), que se basa en la utilización de dos anticuerpos con afinidad específica para la molécula de OPG. Durante la fase de incubación los anticuerpos reaccionan con la molécula de OPG formando un complejo tipo sandwich. En un segundo paso se añade estreptavidina-peroxidasa que reacciona con uno de los anticuerpos marcado con biotina. Los valores de referencia oscilan entre 0 y 625 pg/mL. El coeficiente de variación intraensayo fue del 8%, y el interensayo inferior a 10%. El límite inferior de detección fue de 2.8 pg/ml (Szulc P et al., 2001).

tRANKL: Se ha empleado el kit total sRANKL ELISA K1016, suministrado por IMMUNDIAGNOSTIC (Bensheim, Deutschland), el cual mide de forma directa las fracciones libre y unida a OPG de RANKL. Se basa en la unión de RANKL a OPG y a un anticuerpo específico para RANKL. En una segunda fase se añade un anticuerpo específico para la molécula de OPG, y como fase final un sustrato de tetrametil bencidina. Los valores de referencia se encuentran entre 0 y 3600 pmol/L. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menor de 3% y menor del 10% respectivamente. El límite inferior de detección fue de 1.5 pg/ml.

### **3.4. Técnicas radiológicas.**

#### **3.4.1. Medición de masa ósea.**

La densidad mineral ósea se evaluó mediante absorciometría dual por rayos X (DXA), empleando para ello el equipo modelo Hologic QDR4500. Este densitómetro utiliza radiografías digitales cuantitativas para medir de forma exacta y rápida el contenido mineral óseo (CMO) en gramos y la densidad mineral ósea (DMO) en gr/cm<sup>2</sup>. En nuestro caso hicimos mediciones en columna lumbar (vértebras L2, L3 y L4) y fémur proximal (cuello, trocánter y triángulo de Ward). La precisión de la medida fue superior al 1% (C.V=1.0% con DMO=1.0 gr/cm<sup>2</sup>) y la resolución espacial de 1.5 mm. El densitómetro se calibra a diario con un fantoma normalizado (Hologic X-Caliber, Hologic Inc., Waltham, MA). A fin de evitar falsas mediciones las vértebras fracturadas, que se identificaron mediante Rx de columna, se excluyeron de la medición de densidad ósea.

#### **3.4.2. Estudio radiológico.**

Se efectuaron radiografías laterales de columna lumbar y torácica para evaluar la aparición de deformaciones en los cuerpos vertebrales desde T4 a L5. Las mediciones se hicieron según los criterios de Genant: con una regla transparente se miden las alturas anterior y posterior de las vértebras desde T4 a T12, y las alturas anterior, media y posterior de L1 a L5. En condiciones normales, en columna torácica, la altura anterior es, como máximo, un 85% de la altura posterior. Se habla de fractura de grado 1 o deformidad leve cuando existe una reducción de la altura anterior, media o

posterior de la vertebra entre un 20 y 25 %; fractura de grado 2 o deformidad moderada cuando la reducción es entre el 25 y el 40%, y fractura grado 3 o deformidad severa a una reducción del 40% de cualquier altura del cuerpo vertebral.

### **3.5. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa SPSS (versión 12.0, Chicago, EEUU). Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación típica y se consideraron como estadísticamente significativos valores p inferiores a 0.05. La normalidad de los datos se determinó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre los diferentes momentos de determinación de cada variable se compararon según el test Chi cuadrado, y las diferencias estadísticas intragrupo se llevaron a cabo empleando el test de Wilcoxon.

El efecto del tratamiento en los diferentes tiempos de estudio se analizó mediante ANOVA de una vía de muestras repetidas. La relación entre los cambios entre diferentes variables se analizaron usando un test de correlaciones bivariadas de Pearson, en el caso de una distribución normal, o de Spearman, si tenía una distribución no normal.

Por último, se realizó un análisis multivariante mediante análisis de regresión lineal múltiple enfrentando los cambios en variables de interés con los cambios en densidad mineral ósea en columna lumbar.

## **4. Resultados.**



## 4. RESULTADOS:

### 4.1. Características basales del grupo de estudio.

Las características basales de las pacientes que completaron el estudio se muestran en las tablas 4.1.1 y 4.1.2.

Tabla 4.1.1: Epidemiología descriptiva de las variables clínicas basales.

VARIABLES CLÍNICAS					
	N	Media	DE	Min	Max
Edad (años)	46	64	6,5	51	78
Años postmenopausia (años)	46	15,4	6,6	1	30
Peso (kg)	46	65,9	9,6	48,2	94
Talla (cm)	46	152,9	6,1	136	166
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	46	28,3	4,3	17,5	39,6
VARIABLES DENSITOMÉTRICAS:					
	N	Media	DE	Min	Max
DMO CL (g/cm <sup>2</sup> )	46	0,721	0,076	0,526	0,830
T score CL	46	-3,2	0,69	-5,0	-2,5
Z score CL	46	-1,49	0,81	-3,7	0,3
DMO CF (g/cm <sup>2</sup> )	46	0,669	0,965	0,401	0,861
T score CF	46	-1,5	0,2	-4,0	0,1
Z score CF	46	-0,13	0,9	-2,6	1,7
DMO CT (g/cm <sup>2</sup> )	46	0,752	0,121	0,322	0,950

Los datos correspondientes a la epidemiología descriptiva de las variables cualitativas se exponen en las tablas 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.5.

Tabla 4.1.3: Epidemiología descriptiva de las variables cualitativas clínicas.

---

**VARIABLES CLÍNICAS:**

		N	Porcentaje
Hábito tabáquico	No fumador	41	89.1
	<20 c/día	5	10.1
	>20 c/día	0	0
Hábito alcoholico	No consumo	46	100
	<40 gr/día	0	0
	>40 gr/día	0	0
Consumo de café	No consumo	23	50
	<2 tazas/día	22	47.8
	>2 tazas/día	1	2.2
Actividad física	Sedentaria	16	65.2
	Actividad moderada	30	34.8
	Actividad intensa	0	0
Ingesta cálcica	0-500 mg/día	17	37.8
	500-1000 mg/día	28	60
	1000-1500 mg/día	1	2.2

---

Tabla 4.1.4: Prevalencia de fracturas osteoporóticas al inicio del estudio.

PRESENCIA DE FRACTURA OSTEOPORÓTICA:		
	N	Porcentaje
Fractura vertebral	14	30.4
Fractura vertebral múltiple	7	15.2
Fractura tercio distal radio	13	28.3
Fractura de cadera	1	2.2
Otras *	6	13
Cualquier fractura	22	47.8

- Tibia, costillas, húmero.

Durante el estudio no se produjeron nuevas fracturas, aunque en 3 pacientes con fractura vertebral se observó un aumento del grado de fractura vertebral según los criterios de Genant respecto a la radiografía basal (en los 3 casos la evolución fue de grado I a grado II).

Tabla 4.1.5: Clasificación de las pacientes en función del IMC.

IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	N	Porcentaje
<20	8	17.4
20-25	24	52.2
>30	14	30.4

## 4.2. Evolución de niveles de calcio, fósforo, PTH y 25 OH vitamina D.

Se observó un leve descenso de los niveles de calcio y fósforo séricos a los 3 y 12 meses de seguimiento. El tratamiento con suplementos de vitamina D produjo un aumento progresivo de los niveles de 25 OH vitamina D estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ). Este aumento fue del 69% a los 3 meses, 79% a los 6 meses y 107.5% a los 12 meses. Los valores de PTH i mostraron un descenso discreto que no alcanzó la significación estadística (Tabla 4.2.1)

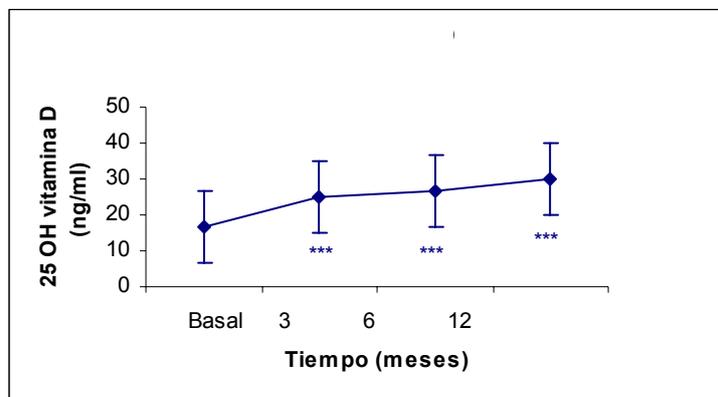
Tabla 4.2.1. Evolución de niveles de calcio, fósforo, PTH y 25 OH vitamina D.

Parámetro	Momento de determinación			
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
Calcio sérico (mg/dl)	9,43 ± 0,39	9,30 ± 0,36*	9,32 ± 0,28	9,26 ± 0,31**
Fósforo sérico (mg/dl)	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,5*	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,4*
PTH-i	56,2 ± 27,3	51,1 ± 26	51 ± 17,7	51,1 ± 17
25 OH vitamina D (ng/ml)	16,5 ± 5,7	25,2 ± 15,9***	26,8 ± 19,5***	30 ± 13,7***

Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal: \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

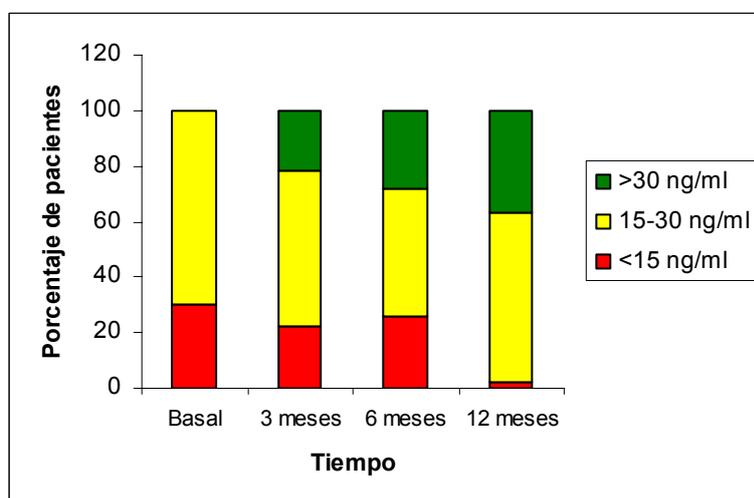
La figura 4.2.1 muestra la evolución de los niveles de vitamina D tras el tratamiento con suplementos.

Figura 4.2.1. Evolución de los niveles de 25 OH vitamina D. Significación intragrupo respecto a determinación basal: \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



Siguiendo los criterios de *Holick y colaboradores, 2005*, al inicio del estudio la totalidad de las pacientes presentaban niveles de 25 OH vitamina D en rango de insuficiencia, es decir, por debajo de 30 ng/ml, mientras que al finalizar el seguimiento solo una paciente mantenía niveles de 25 OH vitamina D inferiores a 15 ng/ml, el 61 % presentaba niveles inadecuados entre 15 y 30 ng/ml y un 37% de las pacientes se encontraba en rango de suficiencia de vitamina D con niveles superiores a 30 ng/ml (Figura 4.2.2).

Figura 4.2.2: Evolución del porcentaje de pacientes con déficit, insuficiencia o suficiencia de vitamina D.



### 4.3. Cambios en densidad mineral ósea.

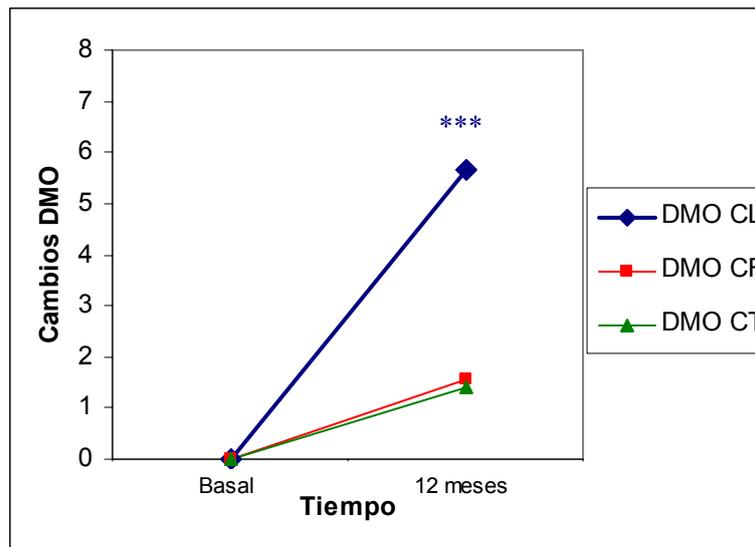
El tratamiento con alendronato produjo un aumento de la DMO a nivel de las tres localizaciones analizadas, aunque sólo los cambios en columna lumbar alcanzaron significación estadística ( $p < 0.001$ ) (Tabla 4.3.1, Figura 4.3.1).

Tabla 4.3.1: Cambios en DMO tras un año de tratamiento con alendronato.

	Basal	12 meses	Cambio %	
<b>DMO CL (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.721±0.076	0.764±0.080	5.65±5.3	p<0,001
<b>DMO CF (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.669±0.096	0.688±0.092	1.56±7.8	p=0.191
<b>DMO CT (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.752±0.121	0.775±0.104	1.39±8.6	p=0.216

Resultados expresados como media ± desviación típica.

Figura 4.3.1: Evolución de la masa ósea en las 3 localizaciones estudiadas.

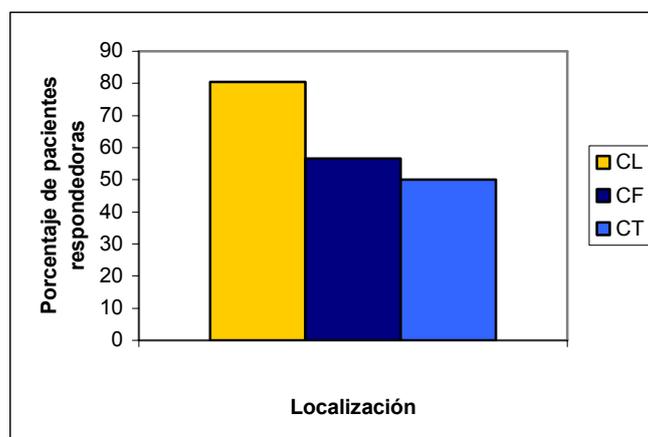


Porcentaje de cambio respecto a DMO basal, \*\*\*  $p < 0.001$

El porcentaje de respuesta al tratamiento se calculó en primer lugar teniendo en cuenta el coeficiente de variación de la determinación de DMO por DXA, que en nuestro caso es del 1%, y considerando como respuesta a tratamiento el aumento o descenso de la DMO por encima de ese valor. También se determinó el porcentaje de respuesta en función de los valores considerados en los estudios clínicos de alendronato: descenso de la DMO mayor del 3 % y aumento superior a 0, 3 y 5% (Rosen CJ et al., 2005) (Figura 4.3.4).

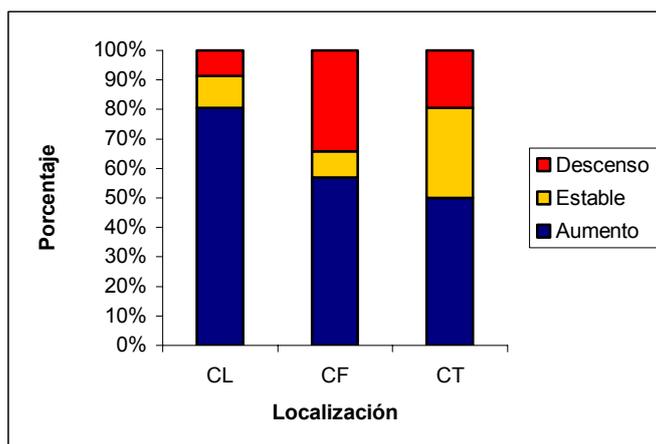
El porcentaje de pacientes respondedoras al tratamiento definido como un aumento de masa ósea superior a 1% en las distintas localizaciones se muestra en la figura 4.3.2. El porcentaje de pacientes respondedoras a nivel de columna lumbar (80.5%) fue mayor que en cuello femoral (52%) y cadera total (50%).

Figura 4.3.2: Porcentaje de pacientes respondedoras al tratamiento en las distintas localizaciones:



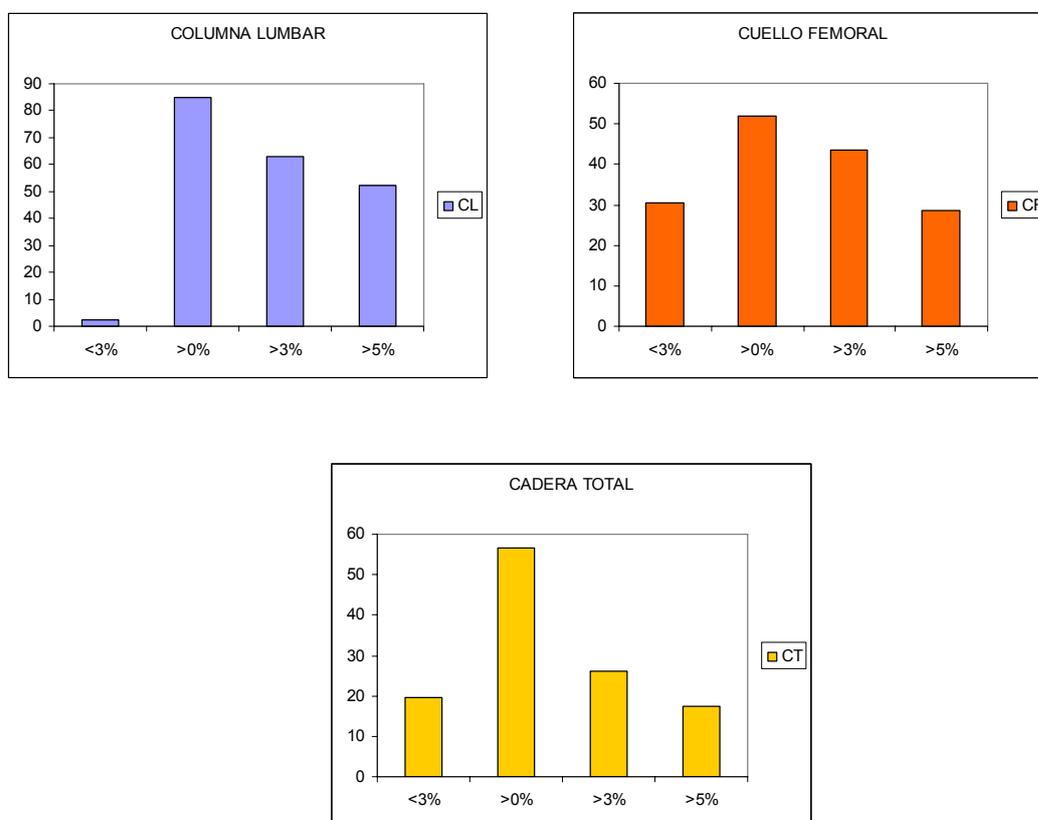
La figura 4.3.3 muestra la evolución de la masa ósea en las diferentes localizaciones. El porcentaje de pacientes no respondedoras (aquellas en las que la masa ósea tras tratamiento permaneció estable o descendió) fue del 19.5 % en columna lumbar, 48 % en cuello femoral y 50% en cadera total. La masa ósea final mostró un descenso respecto a la final en un 8.5 % de las pacientes a nivel lumbar, 39 % en cuello femoral y 19.5% en cadera total.

Figura 4.3.3: Evolución de la DMO en las 3 localizaciones tras el tratamiento.



La figura 4.3.4 muestra el porcentaje de respuesta en las 3 localizaciones estudiadas considerando los valores de cambio de DMO empleados en los ensayos clínicos de alendronato.

Figura 4.3.4: Porcentaje de respuesta en las 3 localizaciones estudiadas.

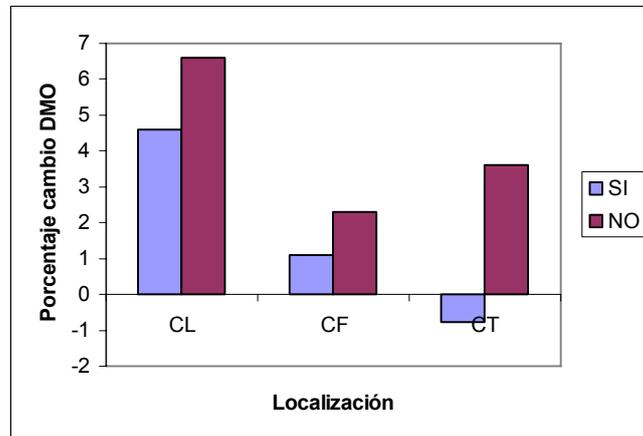


En las pacientes con presencia de fractura osteoporótica la ganancia de masa ósea con el tratamiento fue menor, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística (Tabla 4.3.2, Figura 4.3.5).

Tabla 4.3.2: Cambios porcentuales en masa ósea en las tres localizaciones en función de la presencia de fractura osteoporótica.

Localización	Presencia de fractura osteoporótica:		
	SI	NO	p
CL	4,6 ± 1,3	6,6 ± 1	0,223
CF	1,1 ± 1,6	2,3 ± 1,7	0,598
CT	-0,76 ± 1,7	3,6 ± 1,8	0,09

Figura 4.3.5: Cambios en masa ósea en las tres localizaciones en función de la presencia de fractura osteoporótica.



#### 4.4. Cambios en marcadores de remodelado:

El tratamiento con alendronato produjo una reducción de los niveles séricos de los diferentes marcadores de remodelado, patente a los 3 meses de tratamiento y mantenida durante el seguimiento (Tabla 4.4.1). Los cambios experimentados por los distintos marcadores se muestran en la figuras 4.4.1 y 4.4.2.

Tabla 4.4.1: Cambios en niveles de marcadores de remodelado tras el tratamiento con alendronato.

Marcador	Tiempo determinación			
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
<b>OC (ng/ml)</b>	1,86 ± 1,66	1,38 ± 2,02	0,84 ± 1,27**	1,19 ± 2,07*
<b>FA total (u/l)</b>	77,6 ± 15,8	66,7 ± 13,3***	63,5 ± 14,1***	65,1 ± 14,7***
<b>FA ósea(ug/ml)</b>	11,9 ± 7,2	7,6 ± 9,0***	8,8 ± 9,9**	9,1 ± 7.9
<b>CTX (ng/ml)</b>	0,28 ± 0,13	0,09 ± 0,07***	0,09 ± 0,09***	0,11 ± 0,13***
<b>TRAP(UI/l)</b>	3,0 ± 0,56	2,65 ± 0,55**	2,82 ± 0,57	3,02 ± 0,70

Resultados expresados como media ±desviación típica

Significación intragrupo respecto a valores basales: \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001

Figura 4.4.1: Evolución de los marcadores de formación tras el tratamiento con alendronato.

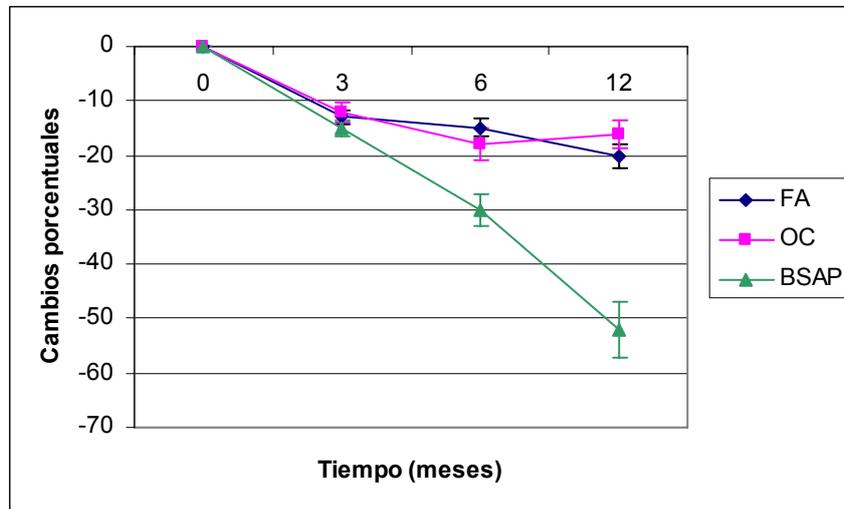
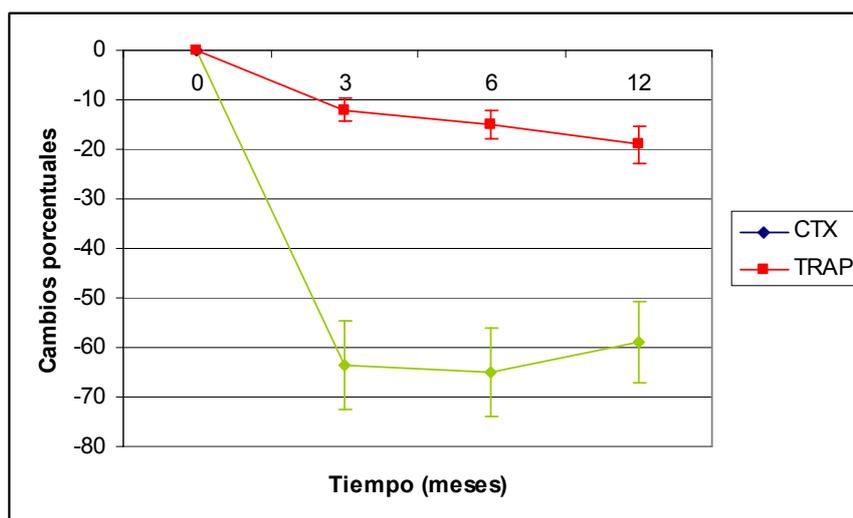


Figura 4.4.2: Evolución de los marcadores de resorción (CTX, TRAP) tras el tratamiento con alendronato.



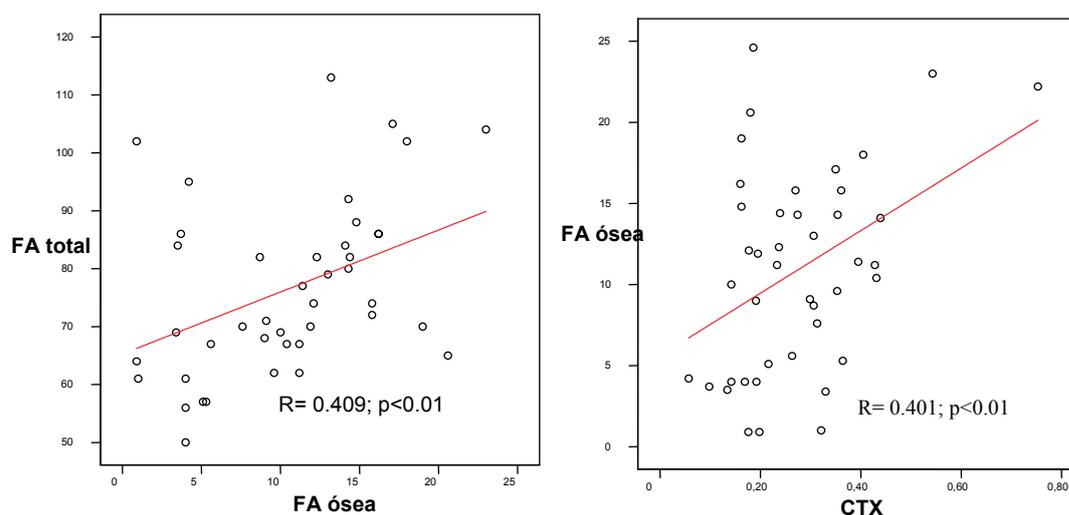
Se observó una correlación positiva entre los niveles basales de FA total y FA ósea, y también entre CTX y FA ósea (Tabla 4.4.2).

Tabla 4.4.2: Correlación entre niveles basales de marcadores de remodelado.

	FA ósea	OC	TRAP	CTX	Cat K
FA total(U/L)	0,409 **	-0,153	-0,123	0,161	-0,068
BSAP(ug/ml)		0,117	-0,017	0,401**	0,118
OC (ng/ml)			0,080	0,039	-0,002
TRAP (U/L)				0,221	0,144
CTX (ng/ml)					-0,040

\* p<0,05 \*\* p<0,01

Figura 4.2.2: Correlación entre niveles basales de marcadores de remodelado.



No existió correlación entre los niveles basales de marcadores de remodelado y la DMO basal.

Al comparar los valores basales de marcadores de remodelado entre las pacientes con que presentaban fractura y pacientes sin fractura no se encontraron diferencias (Tabla 4.4.4).

Tabla 4.4.4: Comparación de niveles basales de marcadores en función de la presencia de fractura osteoporótica.

<b>Marcador</b>	<b>Fracturadas</b>	<b>Sin fractura</b>	<b>p</b>
<b>FA total(u/l)</b>	79,8±17,4	76,38±15	0,491
<b>FA ósea(ug/ml)</b>	9,7±5,3	12,8±7,7	0,106
<b>OC(ng/ml)</b>	2,2±2,0	1,6 ±1,2	0,276
<b>CTX(ng/ml)</b>	0,27±0,11	0,28±0,14	0,792
<b>TRAP(UI/l)</b>	2,9± 0,6	3,1±0,5	0,370

#### 4.5. Efecto del tratamiento sobre los niveles séricos de catepsina K.

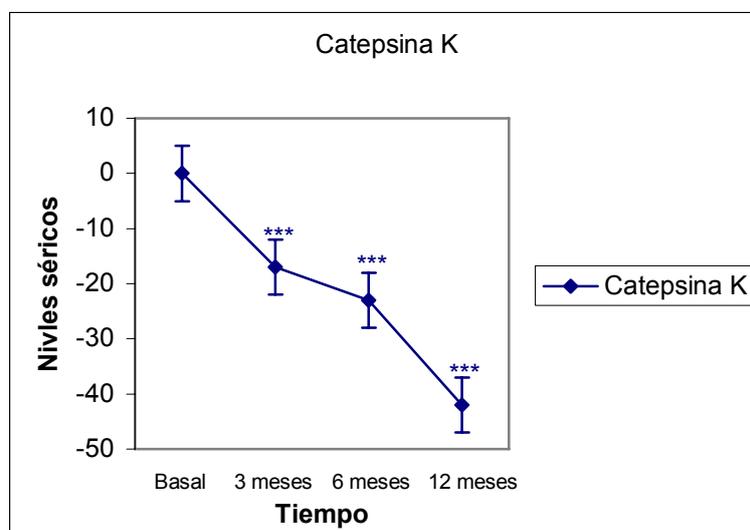
El tratamiento con alendronato produjo un descenso significativo de los niveles séricos de catepsina K como se muestra en la tabla 4.5.1. Este descenso fue del 17 % a los 3 meses, 22 % a los 6 meses y 41 % a los 12 meses de tratamiento ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.5.1).

Tabla 4.5.1. Evolución de los niveles séricos de catepsina K tras el tratamiento con alendronato.

	Tiempo determinación			
Catepsina K (pmol/l)	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
	9,2 ± 11,1	7,8 ± 8	6 ± 4,8	4,6 ± 4,6

Resultados expresados como media ± desviación típica

Figura 4.5.1: Cambios porcentuales en niveles séricos de catepsina K tras un año de tratamiento con alendronato. Significación intragrupo respecto a valores basales: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .



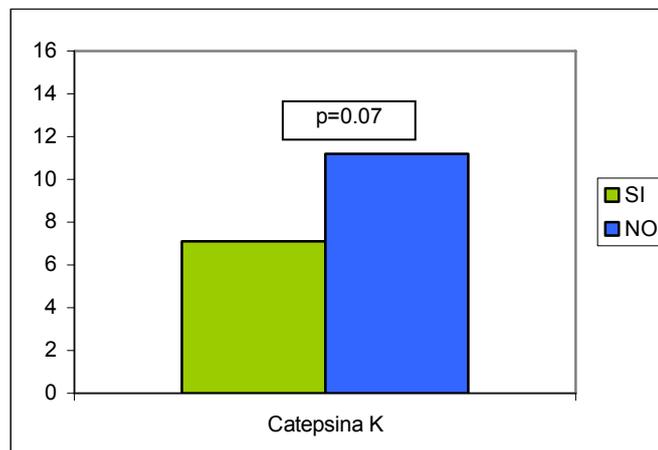
Los valores basales de catepsina K no mostraron diferencias entre las pacientes con fractura y no fracturadas ( $p < 0.07$ ) (Tabla 4.5.2).

Tabla 4.5.2: Comparación de niveles basales de catepsina K en función de la presencia de fractura osteoporótica.

	<b>Fracturadas</b>	<b>Sin fractura</b>	<b>p</b>
<b>Catepsina K (pmol/L)</b>	7,1± 3,6	11,2±14,2	0,07

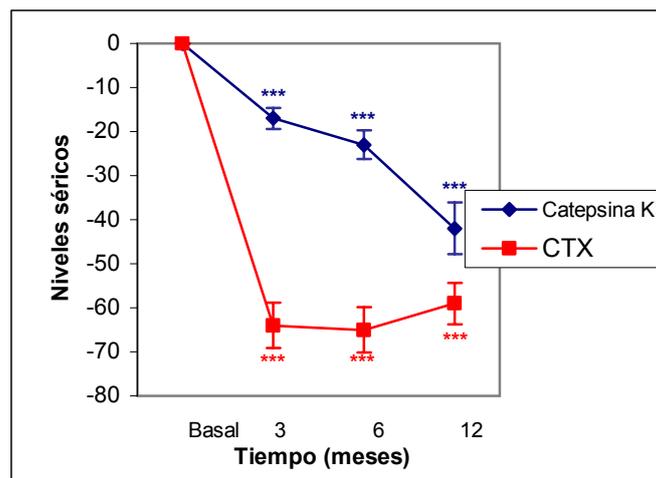
**Resultados expresados como media ± desviación típica**

Figura 4.5.2: Comparación de niveles basales de catepsina K en función de la presencia de fractura osteoporótica.



En la figura 4.5.3. que representa de forma conjunta los cambios en catepsina K y CTX tras el tratamiento con alendronato se puede observar un descenso precoz de los niveles de CTX que se mantiene en el tiempo, mientras que la reducción de los niveles séricos de catepsina K es más tardía (Figura 4.5.3).

Figura 4.5.3: Cambios porcentuales en niveles séricos de catepsina K y CTX tras un año de tratamiento con alendronato. Significación intragrupo respecto a valores basales:  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .



#### 4.6. Cambios en OPG y RANKL total.

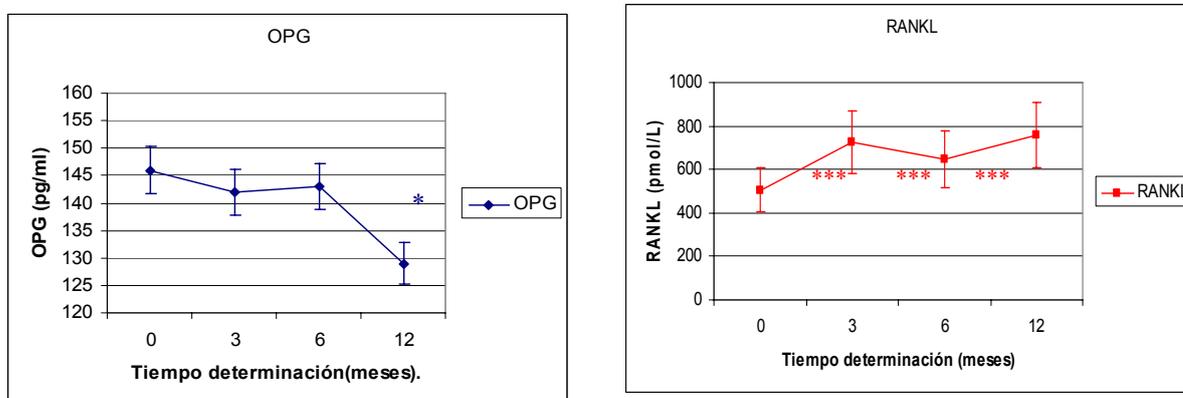
Los niveles basales de OPG, RANKLtotal y ratio RANKL/OPG, así como su evolución con el tratamiento se exponen en la tabla 4.5.1. Los niveles séricos de OPG mostraron un descenso tras el tratamiento que solo alcanzó la significación estadística a los 12 meses de tratamiento ( $p < 0.05$ ). Los niveles séricos de RANKL total aumentaron de forma significativa respecto a la situación basal durante el seguimiento ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.5.1).

Tabla 4.5.1: Cambios en sistema OPG/RANKL.

	Tiempo determinación			
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
OPG (pg/ml)	146,2±77,3	141,8±78,9	143,3±76,8	128,8±35,7*
RANKL (pmol/l)	505,5±911,7	727±1091,3***	648,4±933,1***	758,8±971,2***
RANKL/OPG	4,6±11,6***	6,1±11,4***	5,6±11,7***	7,5±14,3***

Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal: \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  .

Figura 4.5.1: Cambios en OPG y RANKL total.



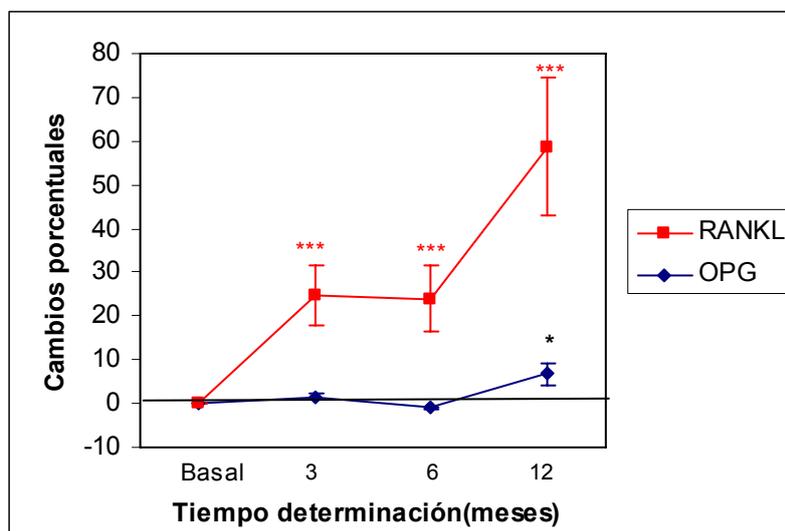
Los niveles basales de OPG y RANKL total no mostraron diferencias entre las pacientes con fractura y sin fractura (Tabla 4.5.2).

Tabla 4.5.2. Comparación de niveles séricos de OPG/RANKL en relación a la presencia de fractura osteoporótica.

	Fracturadas	Sin fractura	p
<b>OPG (pg/ml)</b>	140,9±45,9	150,7± 97	0,733
<b>RANKL total (pmol/l)</b>	434,5 ±826,4	990,6±198,1	0,587

Resultados expresados como media ± desviación típica.

Figura 4.5.2. Cambios en niveles séricos OPG y RANKL tras el tratamiento.



Significación intragrupo respecto a determinación basal: \* p<0,05 \*\*\* p<0.001.

## 4.7. Relación entre cambios en masa ósea, OPG, RANKLtotal y marcadores de remodelado.

### 4.7.1. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en marcadores de remodelado.

El descenso en los niveles séricos de CTX a lo largo del tratamiento se correlacionó de forma negativa con los cambios en masa ósea a nivel de columna lumbar.

Figura 4.7.1.1: Correlación lineal entre cambios en masa ósea a nivel de columna lumbar y cambios en niveles séricos de CTX a los 3 meses de tratamiento.

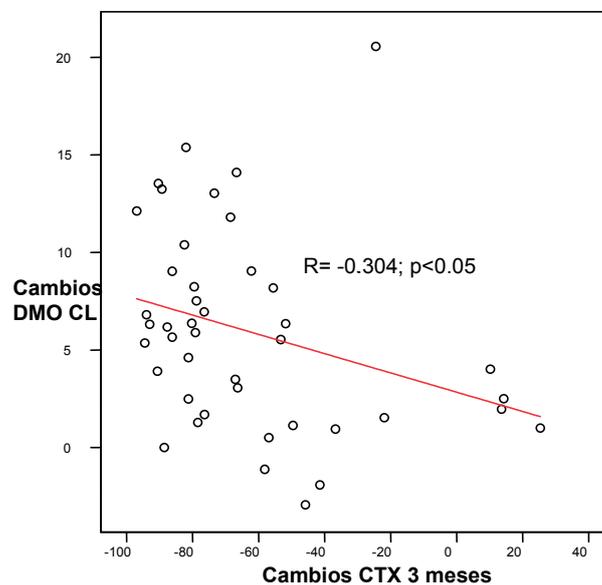


Figura 4.7.1.2: Correlación lineal entre cambios en masa ósea a nivel de columna lumbar y cambios en niveles séricos de CTX a los 6 meses de tratamiento.

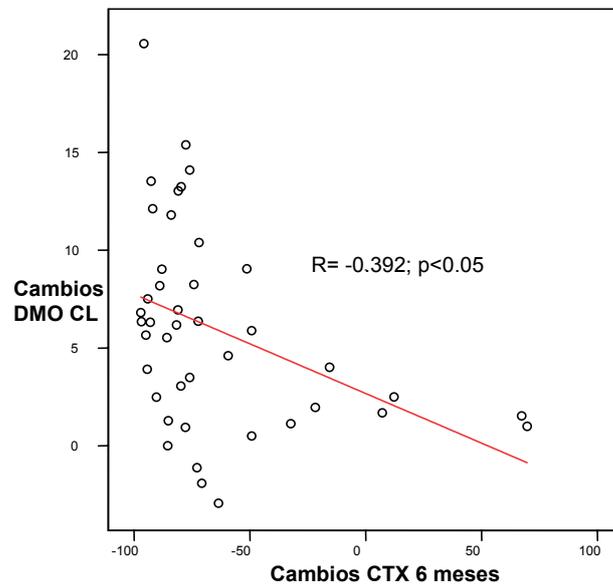
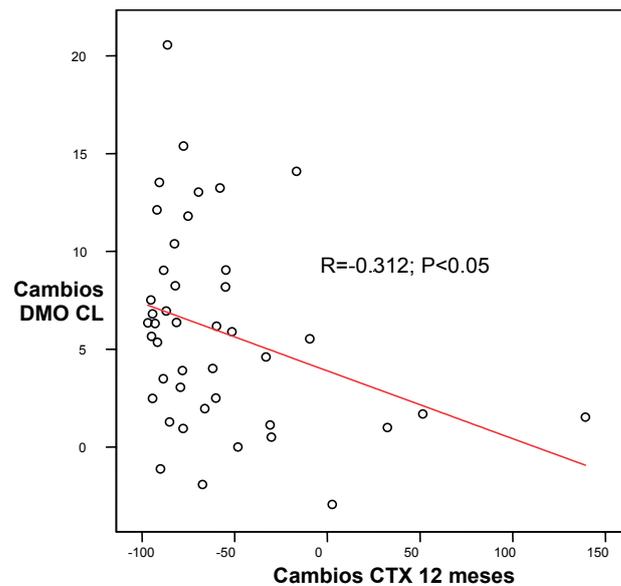


Figura 4.7.1.3: Correlación lineal entre cambios en masa ósea a nivel de columna lumbar y cambios en niveles séricos de CTX a los 12 meses de tratamiento.



Los cambios en niveles séricos de catepsina K y otros marcadores de remodelado no se correlacionaron con los cambios en masa ósea (Tablas 4.7.1.2 y 4.7.1.3).

Tabla 4.7.1.2: Correlación entre cambios en catepsina K y cambios en masa ósea.

Cambios en masa ósea	Cambios en catepsina K		
	3 meses	6 meses	12 meses
<b>CL</b>	-,167	-,033	,271
<b>CF</b>	-,122	-,097	-,178
<b>CT</b>	,085	-,106	-,112

Coefficiente de correlación de Pearson, \* p<0,05 \*\* p<0,01

Tabla 4.7.1.3: Correlación entre cambios en marcadores de remodelado y cambios en masa ósea.

Cambios DMO	Cambios en marcadores					
	FA ósea	FA ósea	FA ósea	OC	OC	OC
	3 meses	6 meses	12 meses	3 meses	6 meses	12 meses
<b>DMO CL</b>	-,057	-,183	,071	-,005	-,042	-,047
<b>DMO CF</b>	-,284	-,136	,105	-,088	-,163	-,237
<b>DMO CT</b>	,112	,203	,076	-,056	,024	,079

Coefficiente de correlación de Pearson, \* p<0,05 \*\* p<0,01

#### 4.7.2. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en OPG/RANKL.

No existió correlación entre los niveles de OPG y RANKL y los cambios en masa ósea tras el tratamiento (Tabla 4.7.2.1).

Tabla 4.7.2.1: Correlación entre cambios en sistema OPG/RANKL y cambios en masa ósea.

Cambios DMO	Cambios OPG/RANKL					
	OPG	OPG	OPG	RANKL	RANKL	RANKL
	3 meses	6 meses	12 meses	3 meses	6 meses	12 meses
DMO CL	,223	-,049	,186	-,122	-,150	-,264
DMO CF	,030	-,177	,261	-,081	,260	-,075
DMO CT	,027	,059	-,142	-,061	,085	-,061

Coefficiente de correlación de Pearson, \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

#### 4.7.3. Correlación entre cambios en marcadores de remodelado y cambios en OPG/RANKL.

El descenso en los niveles séricos de FA ósea y OC a los 12 meses se correlacionó de forma negativa con los cambios en OPG a los 12 meses ( $p < 0,01$ ). Existió también una correlación negativa entre el descenso de CTX a los 12 meses y los cambios en OPG a los 6 meses de tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4.7.3.1).

Tabla 4.7.3.1: Correlación entre cambios en sistema OPG/RANKL y cambios en marcadores de remodelado.

Cambios marcadores		Cambios OPG/RANKL					
		OPG	OPG	OPG	RANKL	RANKL	RANKL
		3 meses	6 meses	12 meses	3 meses	6 meses	12 meses
<b>FA total</b>	<b>3</b>	-,161	-,095	,032	-,075	-,027	-,047
	<b>6</b>	-,117	-,067	,065	-,099	-,022	-,086
	<b>12</b>	,028	,111	,175	-,213	-,065	-,290
<b>FA ósea</b>	<b>3</b>	,066	,032	-,139	-,055	-,216	,142
	<b>6</b>	-,007	-,057	-,616**	-,058	-,161	,204
	<b>12</b>	,088	-,057	,061	,055	,048	,023
<b>OC</b>	<b>3</b>	,096	,111	-,098	,040	,023	,092
	<b>6</b>	,008	,057	-,118	,080	,065	,132
	<b>12</b>	,233	,300	-,436**	,096	,062	,189
<b>TRAP</b>	<b>3</b>	,167	,076	,013	,216	,355*	,272
	<b>6</b>	,270	,184	,020	-,086	,122	,027
	<b>12</b>	-,137	-,186	,051	,070	,174	,079
<b>CTX</b>	<b>3</b>	-,049	-,067	,001	,000	,205	,126
	<b>6</b>	-,084	-,149	,018	-,118	-,021	,042
	<b>12</b>	-,117	-,307*	,131	,012	-,006	,006

Coefficiente de correlación de Pearson, \* p<0,05 \*\* p<0,01

**4.7.4. Capacidad de predicción de cambios en DMO columna lumbar en función de cambios en marcadores de remodelado, catepsina K y OPG/RANKL.**

Con el fin de determinar el efecto independiente de los cambios en marcadores de remodelado, catepsina K y sistema OPG/RANKL en los cambios en DMO en región lumbar, realizamos un regresión lineal múltiple.

Se consideraron las variables clínicas, antropométricos, bioquímicas, marcadores de remodelado, catepsina K, OPG y RANKL total. Tras ajustar por el resto de variables introducidas, los cambios en la DMO en columna lumbar se correlacionaron de forma independiente con los cambios en CTX sérico a los 3 meses (Tabla 4.7.4.1).

Tabla 4.7.4.1: Regresión lineal múltiple: cambios en densidad mineral ósea en región lumbar.

Cambios tras 3 meses de tratamiento:	Correlación simple con cambios DMO CL		Correlación parcial ajustada por edad, presencia de fracturas, IMC, cambios en PTH y vitamina D y resto de variables	
	r	p	r	p
OPG	0.223	0.147	0.197	0.147
RANKL	-0.122	0.431	-0.099	0.431
FA total	-0.005	0.976	-0.008	0.976
FA ósea	-0.057	0.714	-0.049	0.714
OC	-0.005	0.972	-0.009	0.972
TRAP	0.010	0.951	0.012	0.951
CTX	-0.304	p<0.05	-0.285	p<0.05
Catepsina K	-0.167	0.279	-0.143	0.279



## **5. Discusión.**



Los aminobifosfonatos son los fármacos mas usados en la actualidad en el tratamiento de la osteoporosis postmenopausica. Dentro de este grupo alendronato ha demostrado reducir el riesgo de fractura tanto vertebral como no vertebral, y existen datos sobre la seguridad de su administración durante al menos 10 años (Bone HG et al., 2004). El tratamiento con alendronato produce un aumento progresivo de la DMO y una reducción marcada de los marcadores clásicos de remodelado. Sin embargo, el efecto de este fármaco sobre el sistema OPG/RANKL y nuevos marcadores de metabolismo óseo como la catepsina K no se encuentra establecido. En el presente estudio analizamos longitudinalmente una cohorte bien caracterizada de pacientes con osteoporosis postmenopáusica tratadas con alendronato durante 12 meses.

### **5.1. Evolución de los niveles de PTH y 25 OH vitamina D.**

En nuestra población, un elevado porcentaje de pacientes presentaban niveles de vitamina D inferiores a 30 ng/ml. Niveles inadecuados de vitamina D se asocian a una menor tasa de absorción de calcio, con desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y aumento del remodelado óseo. Estudios recientes señalan que son necesarios niveles superiores a 30 ng/ml para evitar el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis (Heaney RP, 2003; Holick MF, 2006), y también se indica su papel sobre la fuerza muscular y el riesgo de caídas, especialmente en pacientes ancianos (Bischoff-Ferrari HA et al., 2004).

Nuestros hallazgos son consistentes con estudios previos que muestran que el déficit de vitamina D es altamente prevalente en distintas poblaciones: infancia (Dahifar H et al., 2006), adultos sanos (Holick MF, 2006), ancianos (Bischoff-Ferrari HA et al., 2005) y osteoporosis postmenopausica (Mezquita-Raya P et al., 2002). Además, un estudio reciente destaca la elevada prevalencia de este déficit incluso en pacientes con osteoporosis postmenopáusica que reciben suplementos como parte de su tratamiento para la osteoporosis (Holick MF et al., 2005).

En nuestro estudio, el tratamiento con suplementos (800 UI de vitamina D y 1000 mg de calcio) mejoró significativamente el estatus de vitamina D de la población. Sin embargo, un alto número de pacientes permaneció con niveles inferiores a 30 ng/ml, por lo que es posible que las recomendaciones actuales sobre el aporte de vitamina D en osteoporosis postmenopausica sean insuficientes teniendo en cuenta la elevada prevalencia de déficit de vitamina D que existe en nuestra población. Si la insuficiencia de vitamina D tiene efectos deletéreos sobre la respuesta al tratamiento con alendronato es un asunto controvertido que debe ser aclarado en futuros estudios. No se encontró correlación entre los niveles basales y tras finalizar el seguimiento de 25OH vitamina D o PTH, ni entre los cambios en sus valores.

## **5.2. Cambios en densidad mineral ósea.**

En nuestro estudio, el tratamiento con alendronato aumentó la densidad mineral ósea en columna lumbar un 5.65%, con significación estadística respecto a la situación basal. En cuello femoral y cadera total la DMO también aumentó un 1.56 y 1.39 % respectivamente aunque estos cambios no alcanzaron la significación estadística. En estudios previos, el promedio del porcentaje de cambio descrito para el tratamiento con alendronato durante un año es del 5.5 % en columna lumbar, 2% en cuello femoral y 2,2 % para cadera total (Bone HG et al., 2005, Rosen CJ et al., 2005). Estos datos son consistentes con nuestros resultados si consideramos que en grandes muestras la variabilidad de la medición de DMO queda reducida, y confirman el adecuado cumplimiento terapéutico de nuestra población.

El porcentaje de pacientes respondedoras al tratamiento, definido como un aumento de masa ósea superior a 1% (coeficiente de variación de la determinación de DMO por DXA), fue mayor a en columna lumbar (80.5%) que en cuello femoral (52%) y cadera total (50%). Se analizó también el porcentaje de pacientes respondedoras en las tres localizaciones estudiadas teniendo en cuenta los umbrales de respuesta empleados en los estudios clínicos de alendronato: descenso de DMO mayor del 3 %, y aumento superior a 0, 3 y 5% (Bonnick S et al., 2006; Rosen CJ et al., 2005). En nuestro estudio, el porcentaje de pacientes respondedoras fue también similar a los estudios publicados previamente e incluso ligeramente superior en columna lumbar.

En las pacientes con fracturas osteoporóticas prevalentes la ganancia de masa ósea con el tratamiento fue menor, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística. No obstante, estudios recientes sugieren que las pacientes que a pesar de recibir tratamiento con alendronato experimentan un descenso de la DMO en columna lumbar o cadera total presentan una disminución del riesgo de fractura vertebral comparado con placebo, por lo que incluso este subgrupo de pacientes se verían beneficiadas en términos de reducción de fracturas (Chapurlat RD et al., 2005).

### **5.3. Cambios en marcadores de remodelado.**

El tratamiento con alendronato en mujeres con osteoporosis posmenopáusica induce una marcada reducción de los marcadores de remodelado, patente a los 3 meses de tratamiento y máxima entre 6 y 12 meses del inicio del mismo. El porcentaje de reducción varía para cada marcador, siendo el descenso medio de CTX sérico del 50-55 % aunque están descritas reducciones de hasta el 70% (Fink E et al., 2000). El descenso medio para NTX sérico es del 30% (Greenspan S et al., 2000), 75 % para NTX urinario, 55% para fosfatasa alcalina ósea (Fink E et al., 2000) y 20 % para fosfatasa alcalina total (Watts NB et al., 2001).

En nuestro grupo de estudio el tratamiento con alendronato produjo una reducción de los niveles séricos de los diferentes marcadores de remodelado similar a la descrita en estudios clínicos previos. La reducción más importante fue para los niveles de CTX con un marcado descenso a los 3 meses (63 % respecto a valores basales) de tratamiento que se mantuvo

durante el seguimiento (64 % y 59 % a los 6 y 12 meses de tratamiento respectivamente). Los valores de fosfatasa alcalina ósea descendieron hasta el 52% a los 12 meses, mientras que el descenso del resto de marcadores de remodelado (OC, TRAP y FA total) fue inferior y en torno al 20% aunque mantenido también durante el tratamiento.

Se ha descrito que el grado de supresión de diferentes marcadores de remodelado durante el tratamiento con alendronato se asocia con la eficacia en términos de DMO a largo plazo (Greenspan SL et al., 1998). En un estudio posterior, el descenso de los niveles séricos de CTX se correlacionó con los cambios en DMO en columna lumbar tras 2.5 años de tratamiento (Greenspan SL et al., 2000). Fink y cols han estudiado la capacidad de diversos marcadores, tanto de formación como de resorción, para identificar en función de sus cambios a aquellas pacientes con osteoporosis postmenopausica que presentarían una mayor respuesta al tratamiento con alendronato. Entre todos los marcadores estudiados, el descenso de CTX a los 4 meses de tratamiento fue el mejor predictor de la ganancia de masa ósea en columna lumbar al año de tratamiento, con solo un falso positivo a pesar de la variabilidad biológica de este marcador. Otros autores proponen la determinación sérica de TRAP5b como marcador de respuesta al tratamiento con alendronato ya que muestra una mayor correlación con los cambios en DMO que la determinación de CTX sérico (Nenonen A et al., 2005) aunque en este estudio la dosis de alendronato empleada fue de 5 mg diarios.

En nuestro estudio el descenso de los niveles de CTX sérico a lo largo del tratamiento se correlacionó de forma negativa con el aumento de masa ósea en columna lumbar lo que coincide con los datos expuestos anteriormente y apoya la utilidad de su determinación en la práctica clínica ya que puede ayudar a predecir la respuesta de masa ósea durante el tratamiento con alendronato.

En nuestra población de estudio al comparar los valores basales de marcadores de remodelado entre las pacientes que presentaban fractura y pacientes sin fractura no se encontraron diferencias. La capacidad de los marcadores de remodelado para identificar pacientes con fracturas prevalentes es controvertida y nuestro estudio no disponía de potencia estadística para identificar dicha asociación.

Tampoco existió correlación entre los diferentes marcadores de remodelado basales y la edad. Los valores basales de FA total y FA ósea mostraron una correlación positiva al igual que los de CTX y FA ósea. Estos hallazgos eran previsibles y ha sido descritos previamente.

#### **5.4. Efecto del tratamiento sobre los niveles séricos de catepsina K.**

Un cuerpo de evidencia sustancial indica que la catepsina K juega un papel clave en la resorción ósea mediada por osteoclastos y la supresión esta enzima resulta en una inhibición de la resorción ósea. Por este motivo, multiples estudios estan evaluando el potencial de los inhibidores de catepsina K como agentes terapéuticos en osteoporosis (Kumar S et al., 2007). Sin embargo, existen pocos datos sobre la importancia de la determinación sérica de catepsina K como marcador de metabolismo óseo en pacientes tratados con antirresortivos y, en particular, alendronato.

Dos estudios previos (Holzer G et al., 2005; Meier et al., 2005) han descrito que las concentraciones séricas de catepsina K se encuentran elevadas en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis frente a osteopénicas y postmenopáusicas sanas. Estos datos sugieren que la determinación de catepsina K podría ser de utilidad para identificar pacientes con osteoporosis postmenopáusica pero su validez diagnóstica no se encuentra establecida.

En nuestra población de estudio la administración de alendronato se asoció a una reducción gradual y progresiva de los niveles séricos de catepsina K (17% a los 3 meses, 23% a los 6 meses y 41% a los 12 meses). Nuestros resultados difieren de los de Holzer y cols quienes no encuentran cambios significativos tras la administración de bifosfonatos aunque los autores no especifican el fármaco usado para el tratamiento de las pacientes con osteoporosis postmenopausica y el grupo solo incluye 18 pacientes.

En otro estudio previo, Meier y cols describen una reducción rápida y sostenida de los niveles séricos de catepsina K desde el primer mes de tratamiento (-33%) en un grupo pequeño de mujeres osteoporóticas tratadas con bifosfonatos. Sin embargo, en ese estudio algunas pacientes fueron tratadas con bifosfonatos intravenosos (zoledronato y pamidronato) y sus efectos biológicos pueden ser diferentes. En nuestro estudio el patrón de los cambios de CTX sérico fue claramente diferente con un descenso rápido y sostenido. El comportamiento desigual de ambos marcadores óseos sugiere que ambos marcadores aportan información diferente sobre la biología del osteoclasto en pacientes tratadas con alendronato. Así, la reducción de CTX es un evento precoz que indicaría disminución de la actividad osteoclástica y los cambios en catepsina K son un fenómeno más tardío que indicaría la apoptosis de estas células. La disponibilidad de marcadores óseos que informen diferencialmente del número y actividad de osteoclastos está recibiendo un interés creciente para conocer el mecanismo de acción de los fármacos antiosteoporóticos (Henriksen K et al., 2006).

Además, concentraciones altas de catepsina K se han relacionado con la presencia de fracturas osteoporóticas múltiples por lo se propone que los niveles de catepsina K podrían ser predictores de fragilidad ósea (Holzer G et al., 2005). En nuestra población de estudio los valores basales de catepsina K entre las pacientes con fractura y las no fracturadas no mostraron diferencias estadísticas, lo que podría explicarse por el elevado porcentaje de pacientes con fractura múltiple que incluye el estudio mencionado a diferencia de nuestro caso en el que solo 9 mujeres (19.5%) presentaban más de una fractura osteoporótica.

## **5.5. Cambios en sistema OPG/RANKL.**

Los estudios realizados hasta ahora sobre el efecto del tratamiento con bifosfonatos sobre el sistema OPG-RANKL son contradictorios y no concluyentes. Estudios *in vitro* realizados en cultivos celulares animales con diferentes concentraciones de pamidronato y alendronato no mostraron cambios en la expresión de RNAm de OPG y RANKL a pesar de inducir una inhibición de la actividad osteoclástica (Kim YH et al., 2002). Sin embargo, en otro ensayo sobre osteoblastos humanos pamidronato y ácido zoledrónico si estimularon la producción de OPG (Viereck V et al., 2002; Beiqing P et al., 2004).

Los pocos estudios publicados *in vivo* también difieren en sus resultados. En pacientes con artritis reumatoide el tratamiento con etidronato no tuvo efecto sobre los niveles de OPG, a pesar de producir una reducción de los marcadores de remodelado (Valleala H et al., 2003). Por el contrario, en pacientes con beta talasemia tratados con pamidronato los niveles de OPG mostraron un descenso significativo con el tratamiento pero solo tras un año de seguimiento (Voskaridou E et al., 2004).

En la enfermedad de Paget se ha descrito una elevación basal de la OPG sérica que se reduce tras el tratamiento con tiludronato (Alvarez L et al., 2003), mientras que el tratamiento con risedronato produce una elevación de OPG de forma inversa al descenso de la fosfatasa alcalina total (Mossetti G et al., 2005), diferencia que puede ser explicada por la diferente vía metabólica de actuación de ambos fármacos. Un estudio reciente con ibandronato tampoco ha demostrado efectos sobre OPG o RANKL en pacientes con hipercalcemia tumoral (Zojer N et al., 2005).

En mujeres con osteoporosis postmenopáusica sólo un estudio ha evaluado los cambios en OPG y RANKL en pacientes que reciben tratamiento con aminobifosfonatos. Los resultados de este estudio muestran un aumento de los niveles de OPG tanto en el grupo tratado con risedronato como en el de alendronato, con una correlación positiva entre el aumento de OPG y los cambios positivos en masa ósea a nivel de cadera (Dobnig H et al., 2005).

Nuestros resultados difieren de este estudio ya que el tratamiento con alendronato produjo una reducción estadísticamente significativa de los niveles de OPG séricos a los 12 meses de tratamiento. Esta reducción fue del 6.5 % a los 12 meses, y se observó además un aumento de los niveles séricos de RANKL total a lo largo del seguimiento de forma estadísticamente significativa. Una explicación posible a nuestros hallazgos es que la determinación de RANKL total integra el RANKL libre y el unido a OPG, por lo que el descenso aparente de los niveles séricos de OPG podría reflejar un aumento de la unión de OPG y RANKL, lo que implicaría un efecto neto beneficioso sobre el hueso.

En contraste con los resultados del trabajo de de Dobnig y cols, en nuestro estudio no existió correlación entre los cambios en los niveles de OPG y RANKL y los cambios en masa ósea tras el tratamiento. Esta discrepancia puede ser explicada por diversas razones. En primer lugar, por las limitaciones de sensibilidad y especificidad que han mostrado los ensayos de OPG, RANKL y, específicamente, RANKL sensible (Kudlacek S et al., 2003; Mezquita Raya et al., 2005). En segundo lugar, a la existencia de fuentes extraóseas de OPG y RANKL que complica la interpretación de resultados basados en la medición de concentraciones circulantes (Rogers A et al., 2005), y por último a la discordancia que existe entre la

determinación sérica de los componentes del sistema OPG/RANKL y lo que sucede a nivel del microambiente óseo.

En nuestro estudio, los niveles basales de OPG no mostraron diferencias entre las pacientes con fractura y sin fractura lo que coincide con resultados previos (Mezquita-Raya et al., 2005) aunque difieren de nuevo de los resultados de Dobnig y cols en los que los niveles basales de OPG fueron un 21% inferiores en las pacientes con presencia de fractura vertebral respecto a las pacientes sin fractura. Por otra parte, en un estudio reciente se ha descrito una asociación entre niveles bajos de RANKL soluble y un mayor riesgo de fractura (Schett G et al., 2004). En nuestro grupo al analizar los niveles de RANKL total en función de la presencia de fractura no se encontraron diferencias.

### **5.6. Relación entre cambios en masa ósea, sistema OPG/RANKL y marcadores de remodelado.**

Los niveles basales de marcadores clásicos de remodelado no se correlacionaron con la DMO basal, lo que coincide con datos previos (Fink E et al., 2000; Greenspan SL et al., 2000). Además, en nuestro grupo de estudio los valores basales de marcadores de remodelado en las pacientes que presentaban fractura osteoporótica no mostraron diferencias respecto a las pacientes sin fractura.

Se ha demostrado que niveles elevados de marcadores de remodelado se asocian a una mayor pérdida de masa ósea y a un aumento del riesgo de fractura, y el descenso de marcadores de remodelado durante diferentes

tratamientos antirresortivos predice la respuesta terapéutica (Bauer DC et al., 2006; Iwamoto J et al., 2005; Greenspan SL et al., 2005). Durante el tratamiento con alendronato el descenso de ciertos marcadores de resorción se correlaciona con los cambios en masa ósea tras 2 años de tratamiento (Greenspan SL et al., 2000), y el marcador que aporta una mayor información es el CTX sérico según algunos autores (Fink E et al., 2000).

Nuestros resultados son consistentes con estudios previos ya que los cambios en CTX a lo largo del tratamiento se correlacionaron de forma negativa con los cambios en masa ósea a nivel lumbar. Además, en el análisis multivariante el porcentaje de cambio de CTX sérico a los 3 meses de tratamiento fue la única variable que tras ajustar por el resto de factores influyentes mostró una correlación negativa con los cambios en DMO en columna lumbar al año de tratamiento. Por el contrario, los cambios en niveles séricos de otros marcadores de remodelado no se correlacionaron con los cambios en masa ósea. Así, dado que actualmente no se recomienda la medida frecuente y repetida de la DMO a través de DXA (Lewiecki EM et al., 2004) la determinación de los niveles séricos de CTX podría dar información sobre los cambios esperables en masa ósea durante el tratamiento con alendronato.

En la actualidad, los datos acerca de la relación entre OPG y DMO son contradictorios. Aunque en la mayoría de los casos no se ha encontrado asociación (Szulec P et al., 2000; Khosla S et al., 2002; Kudlacek S et al., 2003; Browner WS et al., 2001) algunos autores si han descrito una asociación positiva entre OPG y DMO basal (Indridason O et al., 2005; Rogers A et al., 2002). En nuestro estudio no existió relación entre los niveles basales de

OPG y la DMO basal, y estos resultados probablemente estén influidos por el tamaño de la muestra y por la escasa magnitud de dicha asociación.

La relación entre los niveles séricos de marcadores de remodelado y los valores de OPG tampoco es concluyente. Así, estudios previos ha descrito una relación inversa (Kudlacek S et al., 2003), ausencia de asociación (Khosla S et al., 2002) o una asociación positiva (Mezquita-Raya et al., 2005; Rogers A et al., 2002). Esta discordancia puede ser reflejo de la compleja regulación del microambiente óseo y de la multitud de factores que han demostrado influir sobre el sistema OPG/RANKL. En el presente estudio no encontramos relación entre los valores basales de marcadores de remodelado y OPG.



## **6. Conclusiones.**



1. En mujeres con osteoporosis postmenopáusica el tratamiento con alendronato (70 mg/semana) durante 1 año se asocia a incrementos de DMO en todas las localizaciones analizadas y alcanza significación estadística en columna lumbar.
2. Un porcentaje elevado de pacientes mantiene valores séricos insuficientes de 25 OH vitamina D a pesar de recibir suplementos (800 UI/día) durante el período de estudio.
3. Los marcadores bioquímicos de resorción y formación ósea analizados disminuyen de forma precoz y sostenida durante el tratamiento con alendronato.
4. La reducción temprana en las concentraciones séricas de CTX es un buen predictor de los cambios observados en DMO tras 12 meses de tratamiento y su determinación puede identificar a pacientes respondedoras.
5. El tratamiento con alendronato produce un descenso gradual y progresivo de los valores séricos de catepsina K. El patrón de disminución de esta enzima puede reflejar el número de osteoclastos y aportar información complementaria a la de otros marcadores de remodelado óseo.
6. Los cambios en las concentraciones circulantes de OPG y RANKL total durante el período de estudio no permiten establecer una relación directa entre este sistema y el tratamiento con alendronato en mujeres con osteoporosis postmenopáusica.



## **7. Bibliografía.**



**Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernick B, Economices AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC.** Essential requirement of BMP2/4 for both osteoclast formation in bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000; 15:663-673.

**Ahlen J, Andersson S, Mukohyama H, Roth C, Backman A, Cornway HH, Lerner UH.** Characterization of the bone resorptive effect of IL-11 in cultures mouse calvarial bones. *Bone* 2002; 31: 242-251.

**Albarga OM, Ralston SH.** Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 65-81.

**Alvarez L, Peris P, Guanabens N, Vidal S, Ros I, Pons F, Filella X, Monegal A, Muñoz-Gómez J, Ballesta A.M.** Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum* 2003; 48:824-828.

**Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Lalli E, Biondi B, Dorio S, Molinari A, Giustina A, Carella C.** High serum osteoprotegerin levels in patients with hypothyroidism: effect of medical treatment. *Bone* 2004; 35:785-791.

**Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Godecke A, Helfrich MH, Reid DM, Ralston SH.** Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001;142:760-6.

**Avignon A, Sultan A, Piot C, Elaerts S, Cristol JP, Dupuy AM.** Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high risk but asymptomatic patients. *Diab Care* 2005; 28:2176-80.

**Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E.** Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 1163-1168.

**Beiqing Pan, Amanda n Farrugia, Luen Bik To, Davis M Findlay, Jonathan Green, Kevin Linch, Andrew CW Zannettino.** The Nitrogen-Containing Bisphosphonate, Zoledronic Acid, Influences RANKL Expression in Human Osteoblast-Like Cells by Activating TNF Converting Enzyme(TACE). *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 19: 147-154.

**Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willet CW, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, Wong JB.** Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* 2004; 291: 1999-2006.

**Bischoff-Ferrari HA, Willet CW, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B.** Fracture prevention with vitamin D supplementation : a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; 293: 2257-64.

**Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, Nevitt MC, Suryawanshi S, Cummings SR.** Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: The Fracture Intervention Trial. *J Clin End Metab* 2000; 85:4118-4123.

**Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, Durant R, Hanesse B, De Talance N, Doucet B, Jeandel C.** Serum leptin levels is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1030-1035.

**Bone HG, Hosking D, Devolegaer JP, Tucci J, Emkey DR, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA.** Ten year's experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Eng J Med* 2004; 350: 1189-1199.

**Bonnick S, Saag KG, Kiel DP, McClung M, Hochberg M, Burnett SA, Sebba A, Kagan R, Chen E, Thompson DE, de Papp AE.** Comparison of weekly treatment of postmenopausal osteoporosis with alendronate versus risedronate over two years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 ;91:2631-7

**Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.

**Bringham FR.** PTH receptors and apoptosis in osteocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002; 2:245-51.

**Brossa A, Tobias J, Zorrilla J, López E, Alabart A, Belmonte M.** Mortalidad a los tres años de pacientes con fractura de fémur. *Med Clin* 2005; 124: 53-54.

**Brown JM, Corey E, Lee ZD, Trae LD, Yun TJ, Tondravi M, Resella RL.** Osteoprotegerin and rank ligand expresión in prostate cancer. *Urology* 2001; 57: 611-616.

**Browner WS, Lui LY, Cummings SR.** Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:631-637.

**Bukowski JF, Dasher CC, Hiranmoy D.** Alternative bisphosphonate targets and mechanism of action. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 746-750.

**Burger EH, Klein-Nulend J, Smith TH.** Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon: a proposal. *J Biomechan* 2003; 36: 1453-1459.

**Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Koshla S, Riggs BL, Turner RT.** Leptin reduces ovariectomy induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001; 142: 3546-3553.

**Chapurlat RD, Palermo L, Ramsay P, Cummings SR.** Risk of fracture among women who lose bone density during treatment with alendronate. The Fracture Intervention Trial. *Osteopor Int* 2005; 16: 842-848.

**Chevalley T, Hoffmeyer P, Bonjour JP, Rizzoli R.** An osteoporosis clinical pathway for the medical management of patients with low trauma fracture. *Osteopor Int* 2002; 13: 450-6.

**Clifford J, Rosen MD.** Postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med* 2005; 353: 595-603.

**Cosman F, Lindsay R.** Therapeutic potential of parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep.* 2004; 2: 5-11.

**Cummings SR, Bates D, Black DM.** Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA* 2002; 288: 1889-97.

**Cummings SR, Melton LJ III.** Epidemiology of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761-1767.

**Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF.** Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )-binding protein by osteoclasts: A mechanism for release of TGF- $\beta$  from bone matrix. *J Biol Chem* 2002; 277: 21352-2160.

**Danifar H, Faraji A, Ghorbani A, Yassobi S.** Impact of dietary and lifestyle on vitamin D in healthy student girls aged 11-15 years. *J Med Invest* 2006; 53: 204-8.

**Davison S, Davis SR.** Hormone replacement therapy: current controversies. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 249-61

**De la Higuera López-Frías M, Fernández García D, Muñoz-Torres M.** Uso clínico de la densitometría. *Rev Clin Esp* 2004; 204:480-2.

**De Laet C, Kanis JA, Óden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, Mc Kloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Meunier PJ, Pols HAP, Reeve J, Silman A,**

**Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J.** The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteopor Int* 2000; Suppl 6: S2-S7.

**De Laet C, Kanis JA, Óden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, Mc Kloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Meunier PJ, Pols HAP, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A.** Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 1330-8.

**Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, Neubort S, Lu SS, Iida-Klein A, Arnett T, Lindsay R.** Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2005 May 1; 95:139-48.

**Díaz Curiel M, Moro MJ.** Prevalencia de osteoporosis densitométrica en la población española. Actualización de osteoporosis. Editorial FHOEMO. Madrid 2001; pp 3-11.

**Dobnig H, Hofbauer LC, Viereck V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A.** Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteopor Int* 2006;17: 693-703.

**Elliot Gibson V, Bogoch ER, Jamal SA, Beaton DE.** Practice patterns in the diagnosis and treatment of osteoporosis after a fragility fracture: a systematic review. *Osteoporos Int* 2004; 15:767-78.

**Enjuanes A, Supervia A, Bagues X, Diez Perez A.** Leptin receptor(OB-R) gene expresión in human primary osteoblasts: confirmation, *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1135-1142.

**Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, Nevitt MC, Kado DM, Hochberg MC, Santora AC, Black DM.** Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48(3): 241-249.

**Espallargues M, Sampietro-Colom L, Estrada MD, Sola M, del Rio L, Setoain J, Granados A.** Identifying bone mass related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: A systematic review of the literature. *Osteopor Int* 2001; 12: 811-822.

**Fahrleitner A, Prender G, Leb G, Tscheliessnigg K.H, Pinswanger-Solkner C, Obermsyer-Pietsch B, Portugaller H.R, Dobnig H.** Serum osteoprotegerin levels is a major determinant of bone density development and prevalent vertebral fracture status following cardiac transplantation. *Bone* 2003; 32: 96-106.

**Farley JR, Stilt-Coffing B.** Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68:43-52.

**Favus M, Emkey R, Leite M et al.** Five-year treatment of osteoporosis in postmenopausal women with oral alendronate: effects on bone mass and turnover and safety. *J Bone Miner Res* 1997; 12: S150.

**Fechtembaum J, Cropet C, Kolta S, Horlait S, Orcel P, Roux C.** The severity of vertebral fractures and health-related quality of life in osteoporotic postmenopausal women. *Osteopor Int* 2005; 16: 2175-9.

**Fernandez Lloret S, Valenzuela Ruiz A, Burgaleta Mezo E, Ortiz Vergara M.** Tablas de composición de alimentos. In: Fernandez Lloret S (ed) Tablas de composición: alimentos, dietas artificiales y productos infantiles. 1997. 3ª Edición. Universidad de Granada, Granada, pp 5-61.

**Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Le Bouc Y, Soubrielle JC.** Differences in the capacity of several bone turnover markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteopor Int* 2000; 11:295-303.

**Formiga F, Pujol R.** Mortalidad por fractura de fémur: analizando las causas de un viejo problema. *Med Clin* 2005; 124: 55-6.

**Fratzl-Zelman Nadja, Valenta A, Roschger P, Nader A, Gelb B, Fratzl P, Klaushofer K.** Decreased bone turnover and deterioration of bone structure in two cases of pycnodysostosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1538-1547.

**Garnero P.** Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk. *Osteopor Int* 2000; S55-S65.

**Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drakel FH, Mc Quensey MS, Foged NT, Delmas PD.** The collagenotic activity of cathepsin K is

unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 32347-32352.

**Garnero P, Hauser E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Bread G, Meunier PG, Delmas PD.** Markers os bone turnover predict hip fractures in elderly women. The EPIDOS prospective Stud. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1531-1538.

**Garnero P, Sornay-Rendu E, Delmas PD.** Low serum IGF-1 and ocurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Lancet* 2000; 355: 898-899.

**Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelberg TC, Koshla S, Rigss BL.** The expresión of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developementally regulated. *Endocrinology* 2000; 141: 4768-4776.

**Gorny G, Shaw A, Oursler MJ.** IL-6, LIF, and TNF  $\alpha$  regulation of GM-CSF inhibition of osteoclastogénesis in vitro. *Exp Cell Res* 2004; 294: 149-158.

**Goto T, Yamaza T, Tanaka T.** Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Micros* 2003; 52: 551-8.

**Goedeladze JO, Drevon CA, Syrversen U, Reseland JE.** Letin stimulates human osteoblastic cells proliferation, de novo collagen syntesis and mineralization. *J Cell Biochem* 2002; 85: 825-836.

**Greenspan SL, Parker RA, Ferguson L, Rosen HN, Maitland-Ramsey L, Karpf DB.** Early changes in biochemical markers of bone turnover predict the long-term response to alendronate therapy in representative elderly women. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1431-1438.

**Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA.** Early changes in markers of bone turnover are associated with long-term changes in bone mineral density in elderly women on alendronate, hormone replacement therapy, or combination therapy: a three-year, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2762-7.

**Greenspan SL, Rosen H, Parker RA.** Early changes in serum N-Telopeptide and C-Telopeptide cross linked collagen type 1 predict long term response to alendronate therapy in elderly women. *J Clin End Metab* 2000; 85: 3537-3540.

**Grigorie D, Neacsu E, Marinnescu M, Popa O.** Circulating osteoprotegerin and leptin levels in postmenopausal women with and without osteoporosis. *Rom J Intern Med* 2003; 41: 409-415.

**Guang-Da X, Hui Ling S, Zhi-Song C, Lin-Shuang Z.** Alteration of plasma concentrations of OPG before and after levothyrosine replacement therapy in hypothyroid patients. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 965-72.

**Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R.** Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin

D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev.* 2002; 23: 763-86.

**Gutierrez G.** Regulación paracrina del hueso. En: *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral.* Jaypo Editores, 2004.

**Haden ST, Glowacki J, Hurwitz S, Rosen C, Leboff MS.** Effects of age on serum dehydroepiandrosterone sulfate, IGF-I, and IL-6 levels in women. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 414-8.

**Hannon R, Eastell R.** Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteopor Int* 2000; Suppl 6: S30-S44.

**Hasserius R, Karlson MK, Nilsson BE, Rendlund-Johnell I, Johnell O.** Prevalent vertebral deformities predict increased mortality and increased fracture rate in both men and women: a 10 year population based study of 598 individuals from the Swedish cohort in the European Vertebral Osteoporosis Study. *Osteopor Int* 2003; 14: 61-68.

**Heaney RP.** Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 83S-99S.

**Heaney RP.** Vitamin D, nutritional deficiency, and the medical paradigm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5107-5108.  
with rheumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 527-530.

**Hermann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, Mann K, Broecker M.** Impact of estrogen replacement therapy in a male

with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5476-84.

**Hofbauer LC, Koshla S.** Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 271-286.

**Hofbauer LC, Heufelder AE.** Role of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79: 245-53.

**Holick MF.** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 353-73.

**Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, Papp AE.** Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal north american women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3215-3244.

**Holzer G, Noske H, Lang T, Holzer L, Willinger U.** Soluble cathepsin K: A novel marker for the prediction of nontraumatic fractures?. *J Lab Clin Med* 2005; 146: 13-17.

**Honkanen RJ, Honkanen K, Kroger H, Alvaha E, Tuppurainen M, Saarikoshi S.** Risk factors for perimenopausal distal forearm fracture. *Osteopor Int* 2000; 11: 265-70.

**Hou WH, Li Z, Buttner FH, Bartnik E, Bromme D.** Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol Chem* 2003; 384: 891-897.

**Huber DM, Bendissen AC, Pathrose P, Sivastava S, Dienger KM, Shevde NK, Pike JW.** Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology* 2001; 142: 3800-8.

**Indridason O, Franzson L, Sigurdsson G.** Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteopor Int* 2005;16:417-23.

**Itoh K, Udaqawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, Higashio K, Quinn MT, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T, Takahashi N .** Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Endocrinology* 2001; 142: 3654-62.

**Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, Uzawa M.** Early changes in urinary cross-linked N-terminal telopeptides of type I collagen level correlate with 1-year response of lumbar bone mineral density to alendronate in postmenopausal Japanese women with osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2005; 23: 238-42.

**Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W.** Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005; 26:743-74.

**Jilka RL.** Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003 ;41:182-5.

**Johnell O, Kanis J.** Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporosis Int* 2005 16: S3-S7.

**Johnell O, Oden A, Coulin F, Kanis JA.** Acute and long term increase in fracture risk after hospitalization for vertebral fracture. *Osteopor Int* 2001; 12: 207-14.

**Johnell O, Oden A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA.** Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteopor Int* 2002; 13:523-26.

**Jonell O, Kanis JA, Óden A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C, De Laet C, Jonsson B.** Mortality after osteoporotic fractures. *Osteopor Int* 2004; 15: 38-42.

**Jono S, Ikari Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, Nishizawa Y.** Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106: 1192-1199.

**Kalkwarf HJ, Khoury JC, Lanphear BP.** Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:257-265.

**Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonhsson B, Oden A, Zethraeus N, Pfleger B, Khaltsev N.** Assessment of fracture risk. *Osteopor Int* 2005; 16:581-589.

**Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, Pols H, Tenenhouse A.** Alcohol intake as a risk for fracture. *Osteopor Int* 2005; 16: 737-42.

**Kanis JA, Johnell O , Oden A ,Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mc Kloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ,Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A.** Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteopor Int* 2005; 16: 155-62.

**Kanis JA, Johnell O , Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B.** Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteopor Int* 2001; 12: 989-995.

**Kanis JA, Odén A, Johnell O, De Laet C, Jonson B, Oglesby AK.** The components of excess mortality after hip fractures. *Bone* 2003; 32: 468-473.

**Kanis JA, Odén A, Johnell O, Jonson B, de Laet C, Dawson A.** The burden of osteoporotic fractures: a method for setting intervention thresholds. *Osteoporosis Int* 2001; 15:20-26.

**Kanis JA.** Diagnosis of osteoporosis and assesment of fracture risk. *Lancet* 2002; 359: 1929-36.

**Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG.** Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone*. 2005;36:758-69.

**Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ III et al.** Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteopor Int* 2002; 13: 394-399.

**Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon EJ, Dunstan C, Riggs B.L.** Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteopor Int* 2002; 13:394-399.

**Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL.** Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteopor Int* 2002; 13:394-399.

**Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR et al.** Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1550-4.

**Khosla S, Bilezikian JP.** The role of estrogens in men and androgens in women. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003; 32:195-218.

**Khosla S, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM.** Relationship of serum steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3555-61.

**Khosla S, Melton LJ, Riggs BL.** Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1443-50.

**Khosla S, Riggs BL, Robb RA, Camp JJ, Achenbach SJ, Oberg AL, Rouleau PA, Melton LJ 3<sup>rd</sup>.** Relationship of volumetric bone density and

structural parameters at different skeletal sites to sex steroid levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5096-5103.

**Kim YH, Kim GS, Jeong-Hwa B.** Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med* 2002; 34:145-151

**Kim JG, Lim KS, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Moon SY.** Relations between interleukin-1, its receptor antagonist gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24:53-7.

**Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhaloibh R, Risteli J, Laitala-Leinolen T, Vuorio E.** Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone* 2005; 36: 159-72.

**Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA III, Berger M.** Patients with prior fracture have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res* 2000; 15:721-39.

**Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, Andersen NH, Mogensen CE, Rasmussen LM.** Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:39-42.

**Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T.** Tumor necrosis alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000; 191: 275-286.

**Kousteni S, Bellido T, Plotkin CA, O'Brien DL, Bodenner L, Han K, Di Gregorio DB, Manolagas SC.** Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen and androgens receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001; 104: 719-730.

**Kudlacek S, Scheneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R.** Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003; 32: 681-686.

**Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ, Hwang SM, Tomaskec T, Yamashita DS, Marquis RW, Oh H, Jeong JU, Veber DF, Gowen M, Lark MW, Stroup G.** A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both *in vitro* and in an acute model of elevated bone turnover *in vivo* in monkeys. *Bone* 2007; 40: 122-131.

**Lambrinoudaki I, Christodoukalos G, Aravantinos L, Antoniou A, Rizos D, Chondros C, Kountouris A, Chrysofakis G, Creatsas G.** Endogenous sex steroids and bone mineral density in healthy Greek postmenopausal women. *J bone Miner Res* 2006; 24: 65-71.

**Langub MC, Monier-Faugere MC, Qi Q, Geng Z, Koszewski NJ, Milluche HH.** Parathyroid hormone/ Parathyroid hormone related peptide 1 receptor in human bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 448-56.

**Lewiecki EM, Watts N, Mc Klung M, Petak S, Bachrak L, Sheperd J, Downs R.** Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3651-3655.

**Linderg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Hallen JM, Carlsten H, Gustafsson JA, Ohlsson C.** Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol.* 2001;17:425-33.

**Lindsay R, Burge RT, Strauss DM.** One year outcomes and costs following a vertebral fracture. *Osteopor Int* 2005; 16: 78-85.

**Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, Hanley DA, Barton I, Broy SB, Licata A, Benhamou L, Geusens P, Flowers K, Strake H, Seeman E.** Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA* 2001; 285: 320-23.

**Lutgens E, Lutgens SPM, Faber BCG, Heeneman S, Gijbels MMJ, de Winter MPJ, Frederik P, van der Made MS, Daugherty A, Sijbers AM, Fisher A, Long CJ, Saftig P, Black D, Daemen M, Cleutjens KB.** Disruption of the Cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* 2006; 113: 98-107.

**McClung MR.** The relationship between bone mineral density and fracture risk. *Curr Osteoporos Rep.* 2005 ;3:57-63.

**Mac Lean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP .** Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350: 2042-2049.

**Mandelin J, Hukkanen M, Li TF, Korhonen M, Lijestrom M, Sillat T, Hanemaaijer R, Salo J, Santavirta S, Konttinen YT.** Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone* 2006; 38: 769-777.

**Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR.** IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Immunol.* 2005 ;175:917-25.

**Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL.** Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57; 385-409.

**Manolagas SC.** Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev* 2000; 21: 115-137.

**Marcus R, Leary D, Scheneider DL, Shane E, Favus M, Quigley CA.** The contribution of testosterone to skeletal development and maintenance: lessons from the androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1032-7.

**Marie PJ.** Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 2002; 190: 297-305.

**Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV, Dunstan CR, Seibel MJ.** Serum cathepsin K concentrations reflect osteoclast activity in women with postmenopausal osteoporosis and patient with Paget 's disease. *Clin Lab* 2006; 52: 1-10.

**Melton LJ, Crowson CS, O'Fallon WM, Wahner HW, Riggs BL.** Relative contributions of bone density, bone turnover, and clinical risk factors to long-term fracture prediction. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 312-318.

**Mezquita Raya P, Muñoz Torres M, de Dios Luna J, Lopez Rodriguez F, Quesada JM, Luque Recio F.** Performance of COLIA 1 polymorphism and bone turnover markers to identify women with prevalent fractures. *Osteopor Int* 2002; 13: 506-512.

**Mezquita-Raya P, Muñoz Torres M, Lopez Rodriguez F, Martinez Martín N, Conde Valero A, Ortego Centeno N, Gonzalez Calvin J, Raya Alveres E, Luna JD, Escobar Jiménez F.** Prevalence of vitamin D deficiency in populations at risk for osteoporosis: impact on bone integrity. *Med Clin* 2002; 119: 85-9.

**Mezquita Raya P, Muñoz Torres M, Luna JD, Luna V, López Rodríguez F, Torres Vela E, Escobar Jiménez F.** Relation between vitamin D insufficiency, bone density, and bone metabolism in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 1408-15.

**Mezquita Raya, P, de la Higuera M, Fernández D, Alonso G, Ruiz Requena M, Luna JD, Escobar- Jiménez F, Muñoz-Torres M.** The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fracture in postmenopausal women. *Osteopor Int* 2005; 16:1368-1374.

**Minuto F, Palermo C, Arvigo M, Barreca AM.** The IGF system and bone. *J Endocrinol Invest.* 2005; 28(8 Suppl):8-10

**Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Viceconti R, Di Domenico G, Cioffi M, Postiglione L, Nunziata V.** Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment. *Bone* 2005; 36:549-554.

**Muñoz Torres M, Alonso G, Mezquita Raya P.** Prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Endocrinología y Nutrición*, 2003; 50(1):1-7.

**Muñoz-Torres M, Mezquita Raya P, Lopez Rodriguez F, Torres Vela E, de Dios Luna J, Escobar Jiménez F.** The contribution of IGF-I to skeletal integrity in postmenopausal women. *Clin End* 2001; 55: 759-766.

**Muñoz-Torres M, de la Higuera Lopez-Frías M, Fernández García D.** Avances en la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando de RANK. *Med Clin* 2004; 122: 75-77.

**Nagasaki T, Inaba M, Jono S, Hiura Y, Tahara H, Shirakawa K, Onoda N, Ishikawa T, Ishimura E, Nishizawa Y.** Increased levels of serum osteoprotegerin and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 347-353.

**Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horjuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N.** Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*. 2003 ;144:5441-9.

**National Osteoporosis Foundation.** Physician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. 2003.

**Nenonen A, Cheng S, Ivaska K, Alatalo S, Lehtimäki T.** Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: Comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1804-1810.

**Nieves JV.** Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr* 2005 ; 81: 1232S-1239S.

**NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy.** *JAMA* 2001; 285:785-95.

**Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE.** Biphasic osteocyte survival and the targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell* 2003; C934-C943.

**Nomura S, Takano-Yamamoto T.** Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 2000; 19: 91-96.

**Okabe R, Natatsuka K, Inaba M, Miki T, Naka H, Masaki H, Moriguchi A, Nishizawa Y.** Clinical evaluation of the Elecsys  $\beta$  CrossLaps serum assay, a new assay for the degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 2001; 47: 1410-1414.

**Okano T.** Vitamin K, D and bone mineral density. *Clin Calcium* 2005; 15: 1489-94.

**Papapoulos SE.** Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. *Bone*. 2006; 38:613-6.

**Parfitt AM.** Targeted and non targeted bone remodelling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; 30: 5-7.

**Pleischifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H.** Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002;23 :90-119.

**Plotkin L, Mathow I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T.** Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: Requirements of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C633-C643.

**Plotkin L, Manolagas SC, Bellido T.** Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 227: 8648-8657.

**Politou M, Terpos E, Anagtopoulos A, Szydlo R, Laffan M, Layton M, Apperley JF, Dimopoulos MA, Rahemtulla A.** Role of RANKL,

osteoprotegerin and MIP -1 in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2004; 126:686-689.

**Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM.** The role of osteoprotegerin and TNF –related apoptosis inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell.* 2004;15:2834-41.

**Quesada JM, Casado A, Diaz C, Barrios L, Cuenca Acevedo R, Dorado G.** Allele frequency determination of Bsm 1 and Fok I polymorphisms of the VDR gene by quantitative real time PCR in pooled genomic DNA samples. *J Steroid Mol Biol* 2004; 89-90: 209-14.

**Reid IR.** Leptin deficiency--lessons in regional differences in the regulation of bone mass. *Bone.* 2004; 34: 369-71.

**Rieman DJ, McLung HA, Dodds RA, Hwang SM, Lark MW, Holmes S, James IE, Drake FH, Gowen M.** Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts. *Bone* 2001; 28. 282-289.

**Riggs BL, Koshla S, Melton LJ.** Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.

**Rogers A, Eastell R.** Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor K $\beta$  ligand: Clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin End Metab* 2005; 90:6323-6331.

**Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R.** Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone

density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4470-4475.

**Roggia C, Tamone C, Cenci S, Pacifici R, Isaia GC.** Role of TNF-alpha producing T-cells in bone loss induced by estrogen deficiency. *Minerva Med* 2004; 95: 125-32.

**Rosen CJ.** Postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med* 2005; 353: 595-603.

**Rosen CJ, Hochberg MC, Bonnick SL, McLung M, Miller P, Broy S, Kagan R, Chen E, Petruschke RA, Thompson DE, de Papp AE.** Treatment with once-weekly alendronate 70 mg compared with once-weekly risedronate 35 mg in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized double-blind study. *J Bone Miner Res* 2005; 20:141-51.

**Ross PD, Kress BC, Parson RE, Wasnich RD, Armour KA, Mizrahi IA.** Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteopor Int* 2000; 11: 76-82.

**Roy DK, O'Neill TV, Finn JD, Lunt M, Silman AJ, Felsenberg D, et al.** Determinants of incident vertebral fracture in men and women: Results from the European Prospective Osteoporosis Study. *Osteopor Int* 2003; 14: 19-26.

**Rubin J, Rubin C, Jacobs CR.** Molecular pathwas mediating mechanical signalling in bone. *Gene*. 2006 15; 367: 1-16.

**Rucker D, Ezzat S, Diamandi A, Khosravi J, Hanley DA.** IGF-I and testosterone levels as predictors of bone mineral density in healthy, community-dwelling men. *Clin Endocrinol* 2004; 60:491-9.

**Sambrook P, Cooper C.** Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367: 2010-2018.

**Sambrook PN, Geusens P, Ribot C, Solimano JA, Ferrer-Barriendos J, Gaines K, Verbruggen N, Melton ME.** Alendronate produces greater effects than raloxifene on bone density and bone turnover in postmenopausal women with low bone density: results of EFFECT (Efficacy of FOSAMAX versus EVISTA Comparison Trial) International. *J Intern Med.* 2004; 255(4):503-11.

**Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, De Rose M, Simpson AH, Mills L, Noble B.** The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 ;88:701-5.

**Simpson AH, Mills L, Noble BL.** The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2006 ; 88:701-5.

**Schett G, Kiechl S, Redlich K, Oberhollenzer F, Weger S, Egger G, Mayr A, Jocher J, Xu Q, Pietschmann P, Teitelbaum S, Smolen J, Willeit J.** Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA* 2004; 291: 1108-1113.

**Scopes J, Massey HM, Ebrahim H, Horton MA, Flanagan AM.** Interleukin-4 and interleukin-13: bidirectional effects on human osteoclast formation. *Bone*. 2001; 29:203-8.

**Skoumal M, Haberhauer G, Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klinger A.** Serum cathepsin k levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlati3n with radiological destruction. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R65-R70.

**Skoumal M, Kolarz G, Haberhauser G, Woloszczuk W, Hawa G, Klinger A.** Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and sinovial fluid. A comparison of patients with longstanding arthritis and osteoarthritis. *Rheum Int* 2004; 26:63-69.

**Sook Oh E, Eung-Jung R, Won Oh K.** Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean Women. *Metab Clin Exp* 2005; 54:49-54.

**Stains JP, Civitelli R.** Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 69-81.

**Stein E, Shane E.** Secondary osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 115-134.

**Steinbuch M, Youker TE, Cohen S.** Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture. *Osteopor Int* 2004; 15: 323-8.

**Syed F, Khosla S.** Mechanism of steroids effects on bone. *Biochem Bio Res Commun* 2005; 328: 688-696.

**Szulc P, Hofbauer C, Heufelder E, Roth S, Delmas PD.** Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin End Metab* 2001; 86:3162-3165.

**Tagayanagi H, Kim S, Taniguchi T.** Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 2002; 4: S227-S232.

**Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, Hakeda Y, Kumegawa M.** Molecular cloning of a posible cysteine proteinasa predominantly expressed in osteoclast. *J Biol Chem* 1994; 269 1106-1109.

**Tonino R, Meunier P, Emkey R, Rodriguez-Portales JA, Menkes CJ, Wasnich R.** Skeletal benefits of alendronate: 7 year treatment of postmenopausal osteoporotic women. *J Clin End Metab* 2000; 85: 3109-3115.

**Trofimov S, Pantsulaia I, Kobylansky E, Livsjits G.** Circulating levels of receptor activator of nuclear factor kB ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumable healthy human population. *Eur J End* 2004; 150: 305-311.

**Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K.** Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that

specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 137-42.

**Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T.** Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important factor in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141: 3478-3484.

**Ueland T, Jemtland R, Godang K, Kjekshus J, Hognestad A.** Prognostic value of osteoprotegerin in heart failure after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1970-6.

**Ueland T.** GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152:327-32.

**Uemura H, Yasui T, Umino Y, Niki H, Takikawa M, Saito S, Furumoto H, Irahara M.** Circulating osteoprotegerin levels in women during GnRH-agonist treatment and their relationships with mineral components and biomarkers of bone turnover. *Bone* 2003; 33:860-866.

**Valleala H, Mandelin J, Laasonen L, Koivula MK, Risteli J, Kontinen YT.** Effect of cyclical intermittent etidronate therapy on circulating osteoprotegerin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol.* 2003; 148: 527-30.

**Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA.** Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001; 11:199-226.

**Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C.** Does a fracture at one site predict later fractures at other sites?. *Osteopor Int* 2002, 13: 624-9.

**Van't Hof RJ, Ralston SH.** Nitric oxide and bone. *Immunology*. 2001; 103:255-61.

**Vanderborght A, Linsen L, Thewissen M, Geusens P, Paus J, Stinissen P.** Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kB ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *J Rheumatol* 2004 Aug; 31(8):1483-90.

**Vanderschueren D, Vandput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C.** Androgens and bone. *Endocr Rev*. 2004; 2: 389-425.

**Vanderschueren D, Venken K, Ophoff J, Bouillon R, Boonen S.** Clinical Review: Sex steroids and the periosteum--reconsidering the roles of androgens and estrogens in periosteal expansion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 9: 378-82.

**Vestegaard P, Rejnmark L, Mosekilde L.** Anxiolytics, sedants, antidepressants, neuroleptics and the risk of fracture. *Osteopor Int* 2006; 17: 807-816.

**Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C.** Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5474-9.

**Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grunder C, Hofbauer LC.** Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 680-686.

**Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palermos J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D.** Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 730-7.

**Weber P.** Vitamin K and bone health. *Nutrition* 2001; 17: 1024-1029.

**Whiting SJ, Vatanparast H, Baxter-Jones A, Faulkner RA, Mirwald R, Bailey DA.** Factors than affect bone mineral accrual in the adolescent growth spurt. *J Nutr* 134; 696S- 700S.

**Oh KW, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW, Oh ES, Baek KH, Kang MI, Choi MG, Yoo HJ, Park SW.** The relationship between circulating osteoprotegerin levels and bone mineral metabolism in healthy women. *Clin End* 2004; 61:244-249.

**Wu F, Mason B, Horne A, Ames R, Clearwater J, Liu M, Evans MC, Gamble GD, Reid IR.** Fractures between the ages of 20 and 50 years increase women's risk subsequent fractures. *Ach Intern Med* 2002; 162: 33-36.

**Xiao Y, Junfeng H, Tianhong L, Lu W, Shulin C, Yu Z, Xiaohua L, Weixia J, Sheng Z, Yanyun G, Min L.** Cathepsin K in adipocyte

differentiation and its potential role in the pathogenesis of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4520-4527.

**Xing L, Óbice BF.** Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 709-720.

**Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K.** Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) : a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-1333.

**Yong Hee Kim, Gwan-Shik Kim, Jeong-Hwa Baek.** Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med* 2002; 34:145-151.

**Zaidi M, Blair C, Moonga BS, Abe E, Huang CL.** Osteoclastogenesis, bone resorption and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 599-609.

**Zaidi M, Moonga BS, Abe E.** Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest.* 2002; 110:1769-71.

**Ziegler S, Kudlacek S, Luger A, Miner E.** Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with the severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 182:175-80.

**Ziolkowska M, Kurwska M, Radzikowska A, Luszczkiewicz G, Wiland P, Dziewczoploski W.** High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor KB ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 2002; 46:1744-1753.

**Zojer N, Brenner K, Kudlacek S, Hawa G, Woloszczuck W, Hofbauer LC, Pecherstorfer M.** Bisphosphonate treatment does not affect serum levels of osteoprotegerin and RANKL in hypercalcemic cancer patients. *Anticancer Res* 2005.

## **8. Actividad científica.**



Los resultados del trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en las siguientes comunicaciones científicas:

Efecto del tratamiento con alendronato sobre los niveles séricos de OPG y RANKL en mujeres con osteoporosis postmenopáusica: resultados a tres meses. REEMO 2004; 13(5): 104-113.

Evaluación de la determinación sérica de catepsina K como marcador de resorción ósea en el seguimiento de mujeres postmenopáusicas tratadas con alendronato. Endocrinol y Nutr 2005; 52: 92.

Influencia del tratamiento con alendronato sobre los niveles séricos de OPG y RANKL en mujeres con osteoporosis postmenopáusica: resultados a 6 meses. Endocrinol y Nutr 2005; 52: 94.

Effects of alendronate treatment on serum levels of OPG and total RANKL in women with postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int 2005, 36(Supl 2): S410

Serum Cathepsin K: a novel bone resorption marker in the evaluation of postmenopausal women treated with alendronate. Calcif Tissue Int 2005, 36(Supl 2): S296

Changes in serum Cathepsin k Levels in the Evaluation of Postmenopausal Women Treated with Alendronate. JBMR 2005; 20 (Supl 1): S252.

Utilidad de la determinación sérica de catepsina K como marcador de resorción ósea en el seguimiento de mujeres con osteoporosis posmenopáusicas en tratamiento con alendronato”. REEMO 2005;14(6): 105.

Efecto del tratamiento con alendronato sobre los niveles séricos de OPG y RANKL total en mujeres posmenopáusicas tratadas con alendronato. Resultados a 12 meses. REEMO 2005; 14(6):116.

Vitamin D inadequacy in patients who are screened for osteoporosis: Calciff Tissue Int 2006; 78(Supl 1): S136.

Cambios en las concentraciones séricas de catepsina K y CTX en mujeres postmenopausicas osteoporóticas tratadas con alendronato. Endocrinol y Nutr 2006; 53: 99.

Changes in Serum Cathepsin K Levels, CTX and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women Treated with Alendronate. ASBMR 2006.

Cambios en niveles séricos de catepsina K, CTX y DMO en mujeres postmenopausicas tratadas con alendronato: Resultados a 12 meses. REEMO 2006;

Prevalencia de hipovitaminosis D en pacientes que consultan para cribado de osteoporosis. REEMO 2006;

## **PREMIOS DE INVESTIGACIÓN:**

### **Premio Investigador Joven.**

“Utilidad de la determinación sérica de catepsina K como marcador de resorción ósea en el seguimiento de mujeres con osteoporosis posmenopáusia en tratamiento con alendronato”. VIII Reunión monográfica SEIOMM, Noviembre de 2005.

### **Premio Mejor comunicación.**

“Prevalencia de hipovitaminosis D en pacientes que consultan para cribado de osteoporosis”. 30 Congreso de la SAEN (Sociedad Andaluza de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición Clínica), Noviembre de 2005.

### **Premio Real Academia de Medicina.**

Catepsina K y resorción ósea: efecto del tratamiento con alendronato en mujeres con osteoporosis postmenopáusia. Granada 2005



## **9. Resumen.**



**TESIS DOCTORAL:** MARCADORES DE METABOLISMO ÓSEO EN MUJERES CON OSTEOPOROSIS POSTMENOPAUSICAS TRATADAS CON ALENDRONATO.

**INTRODUCCIÓN:** Los aminobifosfonatos son los fármacos mas usados en la actualidad en el tratamiento de la osteoporosis postmenopausica. Dentro de este grupo alendronato ha demostrado reducir el riesgo de fractura tanto vertebral como no vertebral, y existen datos sobre la seguridad de su administración durante al menos 10 años. El tratamiento con alendronato produce un aumento progresivo de la DMO y una reducción marcada de los marcadores clásicos de remodelado. Sin embargo, el efecto de este fármaco sobre el sistema OPG/RANKL y nuevos marcadores de metabolismo óseo como la catepsina K no se encuentra establecido.

**OBJETIVOS:** Evaluar el efecto de la administración de alendronato (70 mg/semana) durante un año sobre marcadores de metabolismo óseo en mujeres con osteoporosis postmenopausica. Analizar las modificaciones inducidas por el tratamiento sobre los valores de masa ósea, 25 OH vitamina D y marcadores de remodelado. Determinar el papel de catepsina K como marcador de metabolismo óseo en mujeres con osteoporosis postmenopausica tratadas con alendronato. Evaluar los cambios en las concentraciones séricas de OPG y RANKL total en esta población.

**PACIENTES:** Tipo de estudio: estudio longitudinal. Tamaño de muestra: 46. Sujetos de estudio: pacientes remitidas para cribado de osteoporosis a la Unidad de Metabolismo Óseo del Servicio de Endocrinología y Nutrición (H. U. San Cecilio). Criterios de inclusión: aceptación de consentimiento informado, estatus postmenopausico y régimen de vida ambulatorio.

Criterios de exclusión: antecedentes de patología metabólica ósea u otras enfermedades con repercusión sobre el metabolismo óseo.

**MÉTODOS:** Se determinaron variables clínicas, parámetros antropométricos, parámetros bioquímicos básicos, PTH-i, 25 OH vitamina D, marcadores de remodelado, OPG (OPG ELISA BI-20402 Immundiagnostic, Bensheim, Deutschland), RANKL total (RANKL ELISA K1016, IMMUNDIAGNOSTIC, Bensheim, Deutschland) y catepsina K (Cathepsin K ELISA BI-20432, Biomedica Gruppe), basal y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento. Se realizó además DXA en columna lumbar y cuello femoral, y estudio radiológico de columna vertebral desde T4 a L5. .

**CONCLUSIONES:** Tras el tratamiento con alendronato durante un año se observó lo siguiente: 1. La DMO aumentó en las tres localizaciones analizadas. 2. Se produjo un descenso precoz y mantenido de los marcadores clásicos de remodelado, mientras que los niveles séricos de catepsina K descendieron de forma gradual y progresiva. 3. Los niveles séricos de OPG descendieron al año de tratamiento, con un aumento paralelo de los niveles séricos de RANKL total, aunque estos cambios no se correlacionaron con los cambios en DMO. 4. Los cambios en CTX se correlacionaron de forma negativa con los cambios en masa ósea en columna lumbar. En conclusión, los cambios en las concentraciones circulantes de OPG y RANKL total no permiten establecer una relación directa entre este sistema y el tratamiento con alendronato en mujeres con osteoporosis postmenopáusica, mientras que la reducción temprana en las concentraciones séricas de CTX es un buen predictor de los cambios observados en DMO tras 12 meses de tratamiento y su determinación puede identificar a pacientes respondedoras.