

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**EFEECTO DE RALOXIFEMO SOBRE
LOS MARCADORES DE
OSTEOCLASTOGÉNESIS EN
MUJERES CON OSTEOPOROSIS
POSTMENOPAUSICA**



Diego Fernández 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, D. Pedro Mezquita Raya y D. Fernando Escobar Jiménez

DIRECTORES:

M. Muñoz Torres P. Mezquita Raya F. Escobar Jiménez

INDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Osteoporosis: concepto y epidemiología.

1.1.1. Concepto de osteoporosis postmenopausica.

1.1.2. Epidemiología.

1.1.3. Consecuencias de la osteoporosis:

1.1.3.1. Fracturas por fragilidad.

1.1.3.2. Costes socioeconómicos.

1.1.3.3. Osteoporosis postmenopáusica.

1.2. Factores de riesgo de osteoporosis y fractura.

1.2.1. Factores de riesgo de osteoporosis.

1.2.1.1. Factores genéticos.

1.2.1.2. Factores nutricionales y estilo de vida.

1.2.1.3. Enfermedades con influencia sobre masa ósea.

1.2.2. Factores de riesgo de fractura.

1.2.2.1. Masa ósea.

1.2.2.2. Presencia de fractura previa por fragilidad.

1.2.2.3. Calidad ósea.

1.2.2.4. Edad.

1.2.2.5. Sexo.

1.2.2.6. Bajo peso.

1.2.2.7. Factores de riesgo de caídas.

1.2.3. Escalas de riesgo de baja masa ósea y osteoporosis.

1.3. Evaluación del paciente con osteoporosis.

1.3.1. Evaluación clínica.

1.3.2. Determinaciones analíticas.

1.3.3. Medición de la masa ósea.

1.3.4. Evaluación radiológica.

1.3.5. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo..

1.4. Remodelado óseo.

1.4.1. Fisiopatología.

1.4.2. Funciones.

1.4.3. Regulación del remodelado óseo.

1.5. Sistema OPG/RANKL.

1.5.1. Descubrimiento y descripción del sistema OPG/RANKL.

1.5.2. Regulación del sistema OPG/RANKL.

1.5.3. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades óseas.

1.5.4. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades extraóseas.

1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado.

1.6.1. Utilidad de los marcadores de remodelado en osteoporosis postmenopausica.

1.6.2. Relación entre marcadores de remodelado y OPG.

1.7. Raloxifeno.

1.7.1. Mecanismo de acción.

1.7.2. Raloxifeno y osteoporosis.

1.7.3. Raloxifeno y riesgo cardiovascular.

1.7.4. Raloxifeno y cáncer de mama.

1.7.5. Perfil de seguridad del raloxifeno.

1.7.6. Raloxifeno y sistema OPG-RANKL.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

2.2. Objetivos específicos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Población de estudio.

3.2. Diseño del estudio.

3.3. Determinaciones hormonales y marcadores de remodelado.

3.3.1. Determinaciones hormonales.

3.3.2. Marcadores de remodelado.

3.3.3. Estudio de marcadores de osteoclastogénesis.

3.4. Técnicas radiológicas.

3.4.1. Medición de masa ósea por DXA.

3.4.2. Estudio radiológico.

3.5. Análisis estadístico.

4. RESULTADOS.

4.1. Características basales del grupo de estudio.

4.2. Evolución de niveles séricos de calcio, fósforo, PTH-i y 25 OH vitamina D.

4.3. Cambios en masa ósea.

4.4. Cambios en marcadores de remodelado.

4.5. Cambios en sistema OPG/RANKL.

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

4.6.1. Relación entre los niveles basales de masa ósea marcadores de remodelado y maradores de osteoclastogénesis.

4.6.2. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en marcadores de remodelado.

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

4.6.4. Análisis de pares por bloques.

4.6.5. Capacidad de predicción de cambios en DMO columna lumbar en función de cambios en marcadores de remodelado, y OPG/RANKL

5. DISCUSIÓN.

6. CONCLUSIONES.

7. BIBLIOGRAFÍA.

8. ACTIVIDAD CIENTÍFICA.

9. RESUMEN.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Osteoporosis: concepto y epidemiología.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente en el hombre. Es una enfermedad metabólica ósea crónica y progresiva cuya prevalencia es especialmente elevada en mujeres postmenopáusicas (Muñoz-Torres et al., 2003). Este proceso es prevenible y tratable, a fin de minimizar la morbimortalidad asociada a la aparición de la complicación más frecuente: las fracturas, cuyo riesgo oscila entre el 30-40% para una mujer de 50 años (Johnell O et al., 2005).

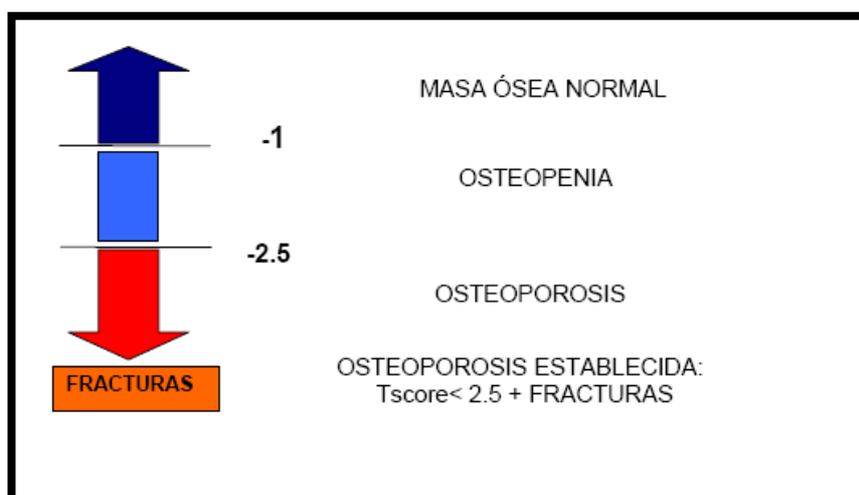
Las estimaciones actuales de prevalencia calculan que existen unos 10 millones de personas afectadas en Estados Unidos, y que ésta aumentará hasta los 14 millones de adultos mayores de 50 años en el año 2025. A nivel mundial, el número de mujeres afectadas es de unos 200 millones. Estas cifras irán en aumento, puesto que, aunque en la actualidad los países más afectados son los pertenecientes al primer mundo, en los países en vías de desarrollo también se está incrementando la longevidad de la población. 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).

1.1.1 Concepto de osteoporosis.

La osteoporosis 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 integración de densidad y calidad óseas (NHI, 2001). La densidad ósea se expresa en gramos de mineral por área de volumen, y está determinado individualmente por el pico de masa ósea y la cantidad de hueso perdido. 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).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1994 unas definiciones basadas en mediciones de masa ósea en cualquier región esquelética para mujeres de raza blanca (WHO Study Group, 1994). Así, se establece como normal 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 entre -1 y $-2,5$); osteoporosis valores de DMO inferiores a $-2,5$ DE (T score inferior a $-2,5$) y osteoporosis establecida cuando junto con las condiciones previas se asocia una ó más fracturas osteoporóticas.



La densidad mineral ósea (DMO) es el indicador principal de riesgo de fractura en mujeres sin fractura previa. El riesgo relativo (RR) de una nueva fractura vertebral se incrementa de 2,0 a 2,4 por cada desviación estandar (DE) de disminución en la DMO, con independencia del sitio de medición (Faulkner KB et al., 2000; J González Macías et al., 2006). Se han descrito hallazgos similares respecto a fractura de cadera y a otras no vertebrales. Numerosos estudios han demostrado que la existencia de fracturas previas incrementa de forma notable el riesgo de nuevas fracturas y el mayor predictor único parece ser el número de fracturas prevalentes (Lindsay et al., 2001; Endsrud & Thompson, 2000).

Dado que la definición de osteoporosis está basada en la masa ósea de mujeres de raza caucásica, existen problemas metodológicos para aplicar esta definición a otros grupos como pueden ser varones, niños y adultos jóvenes. 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).

1.1.2. Epidemiología.

La osteoporosis es reconocida como enfermedad específica desde tiempos de Hipócrates. La osteoporosis afecta a una de cada cuatro mujeres y a uno de cada ocho varones a partir de los 50 años, aumentando la incidencia de forma significativa en las mujeres después de la menopausia, hasta el punto que hoy se estima que es la enfermedad crónica más prevalente en todo el mundo, especialmente en mujeres mayores de 65 años; basándose en los criterios de la OMS, se ha estimado que el 54% de las mujeres de raza blanca postmenopáusicas, en EEUU, tienen osteopenia y otro 30% más

padecen osteoporosis. 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 lumbar en mujeres aumenta progresivamente con la edad desde un 4,3% para el grupo de edad de 45-50 años, hasta un 40% para las mayores de 70 años (Muñoz-Torres, 2003). En la región femoral, va desde un 5,7% en la década de los sesenta hasta un 24,2% en mayores de 70 años (Naves M et al., 2005). Para los varones, la prevalencia de osteoporosis densitométrica es del 8,1% en mayores de 50 años (Naves M et al., 2005).

1.1.3 Consecuencias de la osteoporosis.

1.1.3.1. Fracturas por fragilidad:

Las fracturas por fragilidad son el signo característico de la osteoporosis, y aunque pueden afectar a cualquier hueso, son especialmente frecuentes en columna, cadera y antebrazo distal. 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. La osteoporosis y la presencia de fracturas son más frecuentes en mujeres que en hombres. Se estima que la fractura del antebrazo distal es cinco veces más frecuente en mujeres y que las fracturas vertebrales y de cadera son cerca del doble más frecuentes que en el hombre; si bien, tomadas todas las

fracturas en conjunto, la fractura vertebral es la que aparece con mayor frecuencia en ambos sexos (Roy DK et al., 2003) (Naves Díaz M et al., 2005).

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 existencia de una fractura vertebral multiplica por 3 el riesgo de sufrir una fractura de Colles, por cerca de 5 veces, la posibilidad de sufrir una nueva fractura vertebral y por más de 6 veces la de sufrir una fractura de cadera, tanto en hombres como en mujeres (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).

La incidencia de la fractura de Colles, aumenta de forma lineal desde los 40 a los 65 años que es a partir de entonces cuando se estabiliza (Honkanen RJ et al., 2000). Además, la fractura de Colles es un factor de riesgo independiente para la futura presentación de fracturas vertebrales o de cadera.

En la fractura de cadera se producen varios hechos que la hacen muy apropiada para ser considerada como modelo de la fractura osteoporótica. En primer lugar, por su relación con la osteoporosis. A partir de los 50 años se asume que la fractura de cadera se debe casi exclusivamente a la osteoporosis, una vez que se excluyen las fracturas patológicas asociadas a neoplasias. Y en segundo lugar, por su dramatismo: los pacientes que sufren una fractura de cadera prácticamente siempre ingresan en un centro hospitalario. Precisamente la necesidad de este ingreso hace que sea

relativamente sencillo recoger todos los casos de esta enfermedad en un momento dado para efectuar estudios epidemiológicos. La incidencia de fractura de cadera es variable según la población analizada (Johnell O et al., 2005). La fractura de fémur es la más grave y la que presenta más repercusiones a corto y largo plazo, con una mortalidad del 12 al 20 %. Existe un incremento de 2.4 a 3 veces del riesgo de fractura de fémur, por cada DE de disminución de la DMO (Cummings et al., 2002). Además este tipo de fractura se ve influenciada por numerosos factores de riesgo independientes de la DMO relacionados con la predisposición a las caídas (Kanis JA et al., 2003).

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% (Naves M et al., 2005).

1.1.3.2. Costes socioeconómicos

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 et al., 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) (Hasserius 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). Estas fracturas se asocian con un mayor riesgo, no sólo de mortalidad, sino también con un descenso importante en la calidad de vida y largas estancias hospitalarias (Alarcon Alarcon T et al., 2004) (Brossa A et al., 2005). En España se calcula que tras una fractura de cadera, sólo el 20% de los supervivientes serán independientes, el 29% precisarán ayuda domiciliaria y el 51% dependerá de un centro de pacientes crónicos.

1.1.2 Osteoporosis postmenopáusica.

El déficit estrogénico es el factor de riesgo más importante para desarrollar osteoporosis (Riggs BL et al., 2002), reconocido ya desde la época de Fulton Albright, quien en los años 40 hablaba de la "osteoporosis postmenopausica". Este mecanismo ha sido apoyado de forma consistente por estudios posteriores que mostraron que la administración de estrógenos prevenía la pérdida ósea inducida por ooforectomía en mujeres perimenopáusicas (Lindsay et al., 1980). Así, en la mujer la fase de pérdida ósea acelerada se inicia en la menopausia, se puede prevenir con tratamiento sustitutivo estrogénico (TSE) y es claramente relacionable con el cese de la función ovárica (Muñoz-Torres et al., 1999; Riggs BL et al., 2002).

El cese de la actividad estrogénica ocasiona un desequilibrio del remodelado óseo con predominio neto de la resorción (Riggs BL et al., 2002) debido a la elevación de distintas citoquinas proresortivas como IL 1, MCSF y TNF α (Linderg MK et al., 2001), lo que provoca un balance óseo negativo. Sus efectos sobre las células óseas están mediados por dos clases de receptores estrogénicos expresados en citoplasma y núcleo: el receptor alfa (α), presente en osteoblastos y osteoclastos; y el beta (β), expresado sólo por osteoblastos. Los estrógenos ejercen además sus efectos positivos a través de un efecto paracrino (Manolagas SC et al., 2002).

Los estrógenos *in vitro*, inhiben el desarrollo de los osteoclastos y favorecen su apoptosis estimulando la producción de TGF β por los osteoblastos (Huber DM et al., 2001). Además, inhiben la producción de IL 6, que es el principal estímulo para la resorción (Pleilshifter J et al., 2002) y previenen en última instancia la apoptosis osteoblástica (Kousteni

S et al., 2001). Además, la deficiencia estrogénica incrementa la apoptosis de los osteocitos (Kousteni S ET AL.,2001), que se ha propuesto como causa de alteración de la función mecanosensora del sistema canalicular de reparación de microdaños y que contribuye en última instancia al aumento de la fragilidad ósea.

1.2. Factores de riesgo de osteoporosis y fractura.

Un factor de riesgo de osteoporosis puede definirse como aquella variable, estado o condición asociado con un mayor riesgo de padecer la enfermedad, y sobre todo una de sus consecuencias determinantes: la fractura.

La probabilidad individual de padecer una fractura osteoporótica está condicionada por múltiples factores. De hecho, cada localización específica de fractura tiene un perfil de factores de riesgo determinado. Generalmente no actúan de forma aislada, sino que es la combinación de varios de ellos lo que aumenta significativamente el riesgo de fractura y puede ser útil para seleccionar a individuos a los que realizar una densitometría ósea e incluso para decidir el inicio del tratamiento farmacológico.

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 sí pueden ser modificados, como el uso de ciertos fármacos y enfermedades de conocida influencia sobre el metabolismo mineral (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 sólo explicaba entre el 20 y el 34% de la variación de la DMO en las diferentes localizaciones esqueléticas (Melton LJ et al., 2003).

1.2.1.1. Factores genéticos.

Algunos aspectos de la osteoporosis tienen un fuerte componente genético, puesto de manifiesto en los estudios epidemiológicos que revelan que la presencia de antecedentes maternos de fractura se relaciona con un mayor riesgo de fractura en las hijas. Sin embargo, la evidencia más clara deriva de los estudios de la densidad mineral ósea (DMO) en gemelos. La heredabilidad de la DMO es elevada; se ha estimado en un 50-80%. De manera que, aunque los estudios en gemelos pueden sobrevalorar la heredabilidad, parece claro que una parte considerable de la variación de los valores de la DMO puede explicarse por factores genéticos, mientras que el resto se debería a factores ambientales.

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 β , 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.

Se han descrito múltiples factores nutricionales influyen tanto en la adquisición como en el mantenimiento de una adecuada masa ósea. Entre todos ellos son de especial importancia, 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). Son necesario además unos niveles adecuados de vitamina D, superiores a 30 ng/ml (Heaney RP et al., 2003; Holick MF et al., 2006) para evitar el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis. Además la vitamina D ha demostrado jugar un papel importante en la regulación de la fuerza muscular (Bischoff-Ferrari HA et al., 2004).

Otros factores nutricionales que han demostrado su influencia en los últimos años son la vitamina K (Weber P et al., 2001; Okano T et al., 2005) asociada de forma positiva con masa ósea y riesgo de fractura, y la vitamina C necesaria para el metabolismo del colágeno (Nieves JV et al., 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).

El 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.

Los efectos del consumo de alcohol sobre masa ósea y riesgo de fracturas no habían sido determinados de forma concluyente. Varios estudios prospectivos han demostrado 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.

De manera consistente se han identificado diversas endocrinopatías relacionadas con alteraciones en la masa ósea. Las más importantes el hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, el hipercortisolismo (tanto endógeno como exógeno) y la diabetes. 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.

La masa ósea baja supone uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de fracturas por fragilidad. Numerosos estudios transversales y prospectivos indican que el riesgo de fractura aumenta entre 1.4 y 2.6 veces por cada DE que disminuye la DMO, medida que refleja la masa ósea de un individuo (Rosen CJ et al., 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. Calidad ósea.

El término calidad, incluido en la actual definición de osteoporosis, sirve para incluir todas aquellas propiedades del hueso que no son explicables por la DMO. La microarquitectura trabecular, la composición orgánica y mineral de la matriz ósea, el remodelado óseo, el grado de mineralización, las microlesiones acumuladas, la viabilidad celular y la cantidad y calidad de los puentes de unión del colágeno son los principales factores que contribuyen a la calidad ósea (McDonnell P, 2007).

A edades diferentes, el riesgo de fractura varía a iguales niveles de densidad ósea, incluso después de ajustar por potenciales factores de confusión. Otra observación interesante se refiere a la respuesta a los tratamientos antirreabsortivos usados en pacientes con osteoporosis: Por un lado, los descensos del riesgo de fractura que se obtienen con los fármacos antirreabsortivos se observan mucho antes de cualquier variación sensible en la densidad ósea y por otro, los descensos obtenidos al final del período de estudio, en general de tres años, son de una magnitud mucho mayor de la esperable para incrementos moderados o pequeños de la misma. Por último, en situaciones como la osteoporosis corticoidea, el riesgo de fractura es extraordinariamente mayor de lo que descensos moderados de densidad ósea permitirían predecir.

Por lo tanto, hay otros componentes de la salud del hueso que la densitometría no mide y que son relevantes para condicionar su fragilidad.

Los podemos agrupar en factores vinculados a la arquitectura ósea y factores relacionados con la calidad de los materiales que componen el tejido óseo. El proceso que constituye el común denominador de todos estos elementos es el remodelado óseo (Bouxsein ML et al., 2003).

Factores arquitectónicos.

Los podemos dividir en arquitectura macroscópica (geometría ósea) y microarquitectura. La *geometría ósea* confiere importantes propiedades biomecánicas al hueso. Dependiente del proceso de modelado y remodelado, es uno de los elementos que se pueden modificar para adaptar el hueso a la pérdida mineral asociada al envejecimiento. Es especialmente relevante en el compartimiento cortical del hueso. La regla general es que cuanto mayor es el tamaño de un hueso, mayor será su resistencia, sin superar, claro está, un cierto límite. Los huesos largos, de estructura cilíndrica, ofrecen un excelente ejemplo de este principio, gobernado fundamentalmente por los valores del momento de inercia transversal. Con exactamente la misma cantidad de hueso, si se dispone en un cilindro de menor diámetro, tendrá un menor momento de inercia y una menor resistencia. Ésta es la explicación de una buena parte de las diferencias de riesgo fracturario entre hombres y mujeres, ya que los primeros tienen huesos más voluminosos. También este mecanismo es uno de los elementos compensatorios que se ha observado en el envejecimiento para paliar los efectos negativos de la pérdida de densidad ósea. Los huesos cilíndricos sufren una expansión perióstica que mejora su resistencia mecánica y compensa, en parte, la pérdida ósea asociada a la edad (Hernandez CJ et al., 2007).

La *microarquitectura ósea* se refiere a la disposición espacial de la trama ósea que constituye fundamentalmente el hueso trabecular. Con el desarrollo de la enfermedad, esta trama se deteriora de forma muy agresiva. Las estructuras horizontales se perforan convirtiéndose en trabéculas lineales. Con el progreso de la enfermedad acaban desapareciendo. Con ello, las trabéculas verticales pierden sus conexiones transversales horizontales y, desde un punto de vista estructural, se alargan y adelgazan a la vez que se desconectan, todo lo cual deteriora exponencialmente su competencia mecánica. A mayor abundamiento, se producen perforaciones parciales en las trabéculas remanentes que actúan como puntos críticos de debilitamiento donde se concentra el estrés mecánico (Muller R et al., 2006; Heaney R et al., 2003).

Factores intrínsecos del material.

El grado de mineralización es una de las propiedades relevantes del tejido óseo. Normalmente el proceso de mineralización del hueso recién formado se produce en un 50-70% durante los dos o tres primeros meses, y se denomina mineralización primaria. La mineralización secundaria se produce a lo largo de años y completa el depósito mineral en la unidad básica de remodelado. El grado de mineralización está relacionado positivamente con la dureza del tejido óseo y negativamente con su fragilidad. La mineralización está vinculada a la homogeneidad del tejido. Aquí también un exceso de homogeneidad actúa como un elemento favorecedor de la transmisión de vectores de fuerza que propenden a una más fácil y rápida propagación de líneas de fractura micro o macroscópicas (Seeman E et al., 2003).

El remodelado óseo constituye un punto importante dentro de la calidad ósea. El remodelado óseo acelerado que se observa típicamente en la posmenopausia perfora las estructuras trabeculares, haciendo desaparecer las mismas. Además aumenta la porosidad cortical. Por último, induce cavidades de reabsorción en las trabéculas remanentes, que las compromete aún mucho más en su capacidad mecánica. Pero el remodelado además influye en el grado y homogeneidad de la mineralización. La calidad ósea, por tanto, tiene importancia en la resistencia mecánica del hueso independientemente de la densidad mineral del mismo. Así, los tratamientos que, más allá de aumentar la densidad, mantienen o mejoran la calidad de hueso, nos ofrecerán el mejor perfil de eficacia y seguridad a corto y largo plazo (Benhamou CL et al., 2007).

Métodos para medir la calidad ósea.

Actualmente no existe un método ideal para valorar la calidad ósea. Sólo disponemos de una serie de herramientas que nos permiten medir aspectos parciales y tal vez complementarios de lo que en conjunto representaría la calidad ósea (Kazakia GJ et al., 2006).

Histomorfometría ósea.

Ha sido el "patrón oro" para estudiar el remodelado óseo. Es un método invasivo que mediante parámetros estáticos y dinámicos (previo doble marcaje con tetraciclinas) es útil para diagnosticar diferentes enfermedades óseas metabólicas. Permite cuantificar el volumen trabecular, el grado de mineralización, el grado de formación, y el volumen de osteoide, entre muchos otros parámetros. Se realiza a partir de una biopsia transilíaca de 8

mm de diámetro y aproximadamente 2 cm de largo. Es una técnica no aplicable sistemáticamente en la clínica.

Resonancia magnética.

Esta técnica de imagen, obtenida mediante un procesamiento digital, permite una reconstrucción de la microarquitectura ósea con una alta resolución, y tiene capacidad de discriminar la transformación de las plataformas trabeculares en varillas y su eventual interrupción. Es una técnica no invasiva que no irradia al paciente (Takahashi M et al., 2004).

Microtomografía computarizada.

A partir de la tomografía se puede lograr una imagen en 3D. Si el estudio es *in vivo*, la resolución es más limitada (100 micras), pero si se realiza a partir de biopsias óseas se puede mejorar sensiblemente la resolución al aumentar la irradiación, consiguiendo imágenes de hasta 1 micra. Mediante Nanotac se pueden obtener imágenes de 0,1 micras (Paschalis EP et al., 2001).

Imagen espectroscópica infrarroja transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging*) (valoración de la ultraestructura).

Permite la evaluación de las propiedades materiales del hueso en un contexto anatómico (sin necesidad de destruir el hueso). Los datos de la cristalización y de la estructura de colágeno que se generan proporcionan imágenes infrarrojas de la cristalización y de la estructura de colágeno. La técnica se basa en el análisis del espectro de absorción, y las mediciones se

han calibrado frente a técnicas de medición estándar. La elevada resolución (5-7 micras) permite la evaluación de material que es heterogéneo en su composición y que varía cada 10 a 20 micras.

Valoración directa de la resistencia con estudios biomecánicos.

Son una serie de pruebas que miden directamente sobre el hueso, una vez extraída una muestra, la resistencia a la fractura del material cuando es sometido a una serie de cargas mecánicas. Es, obviamente, el método más directo de cuantificar la resistencia ósea, aunque no representa exactamente lo que sucede *in vivo*, ya que se excluye el efecto de otros tejidos (graso, muscular) que influirían en la resistencia global (Hernandez CJ et al., 2006). Comprende estudios de doblamiento, torsión y compresión.

Tomografía por emisión de positrones.

Es una nueva técnica que rastrea todo el cuerpo con F-fluoride y ^{99m}Tc-MDP. Puede estimar el remodelado global (Blake GM et al., 2002) y, por tanto, ofrecer un mapa del estado regional del remodelado en cualquier territorio del esqueleto. La imagen funcional permite una cuantificación directa del metabolismo en sitios específicos del organismo, incluyendo la columna lumbar, muy importante desde el punto de vista clínico (Cook GJR et al., 2000). El uso de esta técnica ha sido validado comparando los índices histomorfométricos de remodelado, que tienen una elevada correlación entre los parámetros cinéticos locales utilizando PET con fluor y los parámetros asociados a la actividad osteoblástica, tales como *bone formation* (grado de formación ósea) y MAR (grado de aposición mineral)(Pierr M et al., 2001).

Análisis fractal a partir de la radiología convencional (análisis textural)

Es una nueva técnica en desarrollo que, a partir de una radiografía simple de columna, permite inferir una tercera dimensión a partir de las diferentes intensidades de luz que registra la placa radiográfica. Recientes estudios refieren una correlación entre este análisis y calidad ósea (Wilkie JR et al., 2004).

En suma, los métodos de que disponemos para medir la calidad ósea son sólo materia de investigación. De todas maneras, el rápido desarrollo de algunos de ellos va a hacerlos accesibles al uso clínico, ofreciendo la posibilidad de valorar la resistencia mecánica ósea, y, por consiguiente, superar las limitaciones de las técnicas disponibles en osteoporosis (Kehoe T, 2006).

1.2.2.4. Edad.

La edad contribuye al riesgo de fractura como un factor independiente de la DMO (Kanis JA et al., 2002) por lo que para cualquier valor de densidad mineral ósea el riesgo de fractura es mucho mayor para edades más avanzadas (McClung MR et al., 2005). El riesgo relativo aumenta de 2 a 3 veces por cada década tras los 50 años. Esta influencia hace que, aunque en función de los cambios en DMO sería 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.

1.2.2.5. 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).

1.2.2.6. 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/m², así como el menor porcentaje de grasa corporal, también se asocian a baja DMO (De Laet C et al., 2005).

1.2.2.7. Factores de riesgo de caídas.

Las situaciones clínicas relacionadas 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 con su uso y un mayor riesgo de fractura por un incremento en las caídas (Vestegaard P et al., 2006).

1.2.3 Escalas de riesgo de baja masa ósea y osteoporosis

Puesto que el cribaje universal de la osteoporosis (OP) mediante densitometría no es factible por su desfavorable relación coste-beneficio, durante los últimos años, se ha propuesto que el diagnóstico, e incluso la indicación de tratamiento de la osteoporosis, debería establecerse sobre una valoración integral de los factores de riesgo de fractura más que sobre la medida aislada de la densidad mineral ósea (DMO), sin olvidar nunca que el riesgo individual de fractura depende, básicamente, de la edad y de la esperanza de vida (Kanis J et al, 2003).

Figura 1.2.3.1. Riesgo de fractura durante el resto de la vida (A) y en los próximos 5 años (B) en 9516 mujeres caucásicas.

A				
Edad/tipo de fractura	50	60	70	80
Cadera	14,3%	13,8%	13,6%	12,3%
Muñeca	14,4%	11,5%	7,6%	4,2%
Vertebral	15,0%	14,7%	13,5%	9,2%
Otras	31,2%	27,9%	22,2%	15,6%
B				
Edad/tipo de fractura	50	60	70	80
Cadera	0,2%	0,6%	1,6%	5,2%
Muñeca	1,6%	2,8%	2,8%	2,0%
Vertebral	0,6%	1,5%	2,9%	4,7%
Otras	6,9%	9,6%	10,9%	13,5%

Adaptada de National Osteoporosis Foundation².

1.2.3.1 Escalas de riesgo de baja masa ósea.

Resulta evidente que debe sospecharse la presencia de OP en mujeres que presenten alguno o varios de los factores de riesgo más predictivos de la enfermedad. Aunque el factor aislado que ofrece más información

pronóstica sobre el desarrollo de fracturas es la baja DMO, debe recordarse que ésta es sólo un factor de riesgo más (Kanis J et al., 2003).

En los últimos años se han desarrollado instrumentos específicos para valorar el riesgo de presentar baja DMO (osteoporosis/osteopenia) y así seleccionar a los candidatos para determinación de DMO que presentan sensibilidad entre alta y moderada, pero con baja especificidad (tabla 1.2.3.1). Las escalas mejor validadas son los tests ORAI (Osteoporosis Risk Assessment Instrument), de 3 ítems, y el SCORE (Simple Calculated Osteoporosis Risk Estimation), de 6 ítems. La National Osteoporosis Foundation (NOF) también recomienda valorar a los pacientes con alguno de los factores de riesgo mayores: edad ≥ 65 años, índice de masa corporal (IMC) $< 22 \text{ kg/m}^2$, historia personal o familiar de fractura osteoporótica, o tabaquismo. El test ORAI utiliza la edad, el peso y el uso de terapia hormonal sustitutiva para valorar el riesgo de presencia de osteoporosis para la indicación de la medida de la masa ósea, presentando una sensibilidad del 90% y una especificidad del 45,1% (valor predictivo positivo 32,5%). El test SCORE tiene publicada una sensibilidad del 90% y una especificidad del 32% (valor predictivo positivo 64%), aunque se ha detectado una menor especificidad en población de más edad. La sensibilidad y especificidad de la escala de la NOF es de 92% y 21%, respectivamente (Jódar E et al., 2005). También recientemente se han validado otras estrategias como la escala OSIRIS, en la que una puntuación mayor de 1 se asocia a elevado riesgo de osteoporosis o baja masa ósea (sensibilidad 85%; especificidad 39%), o el proyecto ORACLE, que aplica una ecuación cuyas variables son los valores de ultrasonografía apendicular, edad, IMC, uso de terapia hormonal sustitutiva, fractura a partir de los 45 años, y que, con un punto de corte de 0,27, presenta un

valor predictivo superior al de los ultrasonidos aislados o de otras escalas con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 50% (Cadarette SM et al, 2001).

En España, se han propuesto algunas estrategias para la identificación de las mujeres en riesgo (Díez et al., 1998): edad > 51 años, peso corporal <70 kg; años de vida fértil < 32 y paridad mayor de 2 hijos. La presencia de dos de estos factores de riesgo tiene una sensibilidad del 62,7% con una especificidad del 70% para osteopenia, lo que permitiría evitar un 35,5% de exploraciones densitométricas. No obstante, cualquiera de estas escalas debe ser validada localmente antes de ser aplicada a una población concreta.

Tabla 1.2.3.1. Escalas para la detección de los pacientes con riesgo de osteoporosis.

Escala	Punto de corte	Factores de riesgo/puntuación
NOF (<i>National Osteoporosis Foundation</i>)	≥ 1	Un punto por: edad > 65, IMC < 22, historia familiar, historia personal, Tabaquismo
SCORE (<i>Simple Calculated Osteoporosis Risk Estimation</i>)	≥ 6	+5 para no afroamericanos, +4 si AR, +4 por cada Frx OP (máximo 12 puntos), +1 ^{er} dígito de la edad x 3, +1 si no THS, -peso en libras/10 (redondeado a número entero)
ORAI (<i>Osteoporosis Risk Assessment Instrument</i>)	≥ 9	Edad: ≥ 75: +15, 65-75: +9, 55-65: +5; peso < 60 kg: +9; no THS: +2
ABONE (<i>Age, Body Size, No Estrogen</i>)	≥ 2	Un punto por: edad > 65, peso < 63,5 kg, no THS o ACO
OST-T (<i>Osteoporosis Self-assessment Tool</i>)	Riesgo moderado (> -9) o alto (>20)	Edad (años)-peso (kg)
ORACLE	0,27	QUS falange, edad, IMC, uso de THS, fractura a partir de 45 años
OSIRIS	≥ 1	Edad: años x -2 (quitar último dígito) Peso: kilos x +2 (quitar último dígito) Uso de THS/ +2 Fractura de baja energía / -2
Díez et al	≥ 2 factores	Edad > 51, peso < 70 kg, < 32 años de vida fértil, > de 2 hijos

IMC: índice de masa corporal; AR: artritis reumatoide; Frx: fractura; OP: osteoporosis, THS: terapia hormonal sustitutiva. ACO: anticonceptivos orales.

1.2.3.2. Escalas de riesgo de fractura osteoporótica.

De forma análoga, y siempre basándose en una población concreta, se han publicado escalas de riesgo de presencia de fractura vertebral indolente (con la población del Fracture Intervention Trial, FIT) o de aparición de fracturas con o sin conocer la DMO (Study of Osteoporotic Fractures, índice FRACTURE) (Jódar E et al, 2005)

También están en proceso de validación otras estrategias de valoración de riesgo de fractura osteoporótica como la aplicación de la escala OSIRIS de riesgo de baja masa. Cambiando los puntos de corte, se pueden clasificar a las pacientes en: de *bajo riesgo* (que no precisan mayor evaluación actual), de *riesgo medio* (que deben ser evaluadas inmediatamente) y de *riesgo alto* (que deberían iniciar inmediatamente tratamiento).

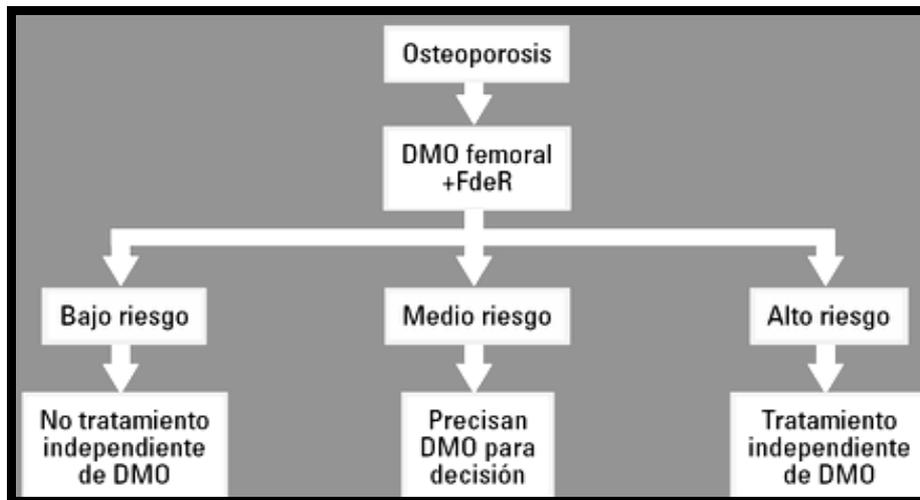
Se han desarrollado y validado otras estrategias que combinan la selección de candidatas para la medición de masa ósea, basada en su bajo peso, seguido de valoración conjunta del valor de DMO junto con los factores de riesgo clínico (edad, antecedentes de caídas, capacidad para caminar en tándem [equilibrio dinámico] y velocidad al caminar), para seleccionar a las personas de mayor riesgo (doble) de fractura osteoporótica de cadera. También recientemente, se ha desarrollado un modelo de predicción de fractura osteoporótica en mujeres con osteopenia densitométrica, que adquiere un interés especial una vez que el estudio NORA ha puesto de manifiesto que un gran número de fracturas osteoporóticas se producen en mujeres con valores de DMO en rango osteopénico. La presencia de un T-score en hueso periférico $< 1,8$ junto a la mala autopercepción del estado de salud y escasa movilidad (lo que supone el 55% de esa población

osteopénica), identifica a un subgrupo de población que casi duplica el riesgo de fractura (4,1% frente a 2,2%).

Así, en la práctica clínica habitual se debiera usar la valoración conjunta de los factores de riesgo de fractura, clasificando a los pacientes en 3 grupos: un primer grupo de muy alto riesgo de fractura independientemente de su valor de DMO (que debiera tratarse siempre), un segundo grupo de muy bajo riesgo (que no se trataría incluso con DMO baja), y un tercer grupo con riesgo intermedio en el que la valoración de la DMO es esencial tanto para el diagnóstico como para la indicación de tratamiento (Kanis et al., 2005).

Cada población tiene un perfil de riesgo diferente, por lo que, tanto los estudios de variables predictivas de baja masa ósea como los de predicción de fracturas osteoporóticas, deben realizarse, o al menos confirmarse, en la población en la que se pretendan aplicar. En cualquier caso, hasta disponer de una herramienta factible y útil para identificar a población de elevado riesgo de osteoporosis y/o fractura, sigue siendo válida la recomendación de búsqueda selectiva de casos en función de factores de riesgo de la guía de práctica clínica de la SEIOMM.

Figura 1.2.3.2. Modelo de actuación clínica en función de los factores de riesgo.



1.3. Evaluación del paciente con osteoporosis.

1.3.1 Evaluación clínica.

El diagnóstico de osteoporosis se basa en la constatación de una baja densidad mineral ósea (DMO) y/o la presencia de fracturas por fragilidad. La sospecha clínica inicial siempre vendrá dada por la anamnesis y en menor grado por datos de la exploración sugerentes de un elevado riesgo de fractura. Por ello, en el estudio del paciente con sospecha de osteoporosis, como en cualquier patología no tributaria de cribado poblacional, la entrevista clínica es básica y fundamental. En ella se deben recoger no sólo los factores de riesgo esqueléticos, sino aquéllos que influyen en la frecuencia y número de caídas, así como la percepción del paciente sobre la enfermedad y otras patologías concomitantes que orienten tanto la actitud diagnóstica como terapéutica.

Una vez realizada la historia clínica, se debe confirmar la sospecha diagnóstica, valorar el grado de riesgo de fracturas, descartar causas secundarias de osteoporosis y planificar con ello la necesidad e intensidad de un tratamiento y/o seguimiento.

La anamnesis 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) (encuesta clínica SEIOMM).

1.3.2 Determinaciones analíticas.

En todo paciente con diagnóstico de osteoporosis, y en particular aquéllos con fracturas por fragilidad que vayan a ser tratados con fármacos, se debe realizar un mínimo perfil analítico que incluya: hemograma, velocidad de sedimentación globular, glucemia, función renal y hepática, calcio y fósforo séricos, proteinograma y TSH. La analítica general, en personas habitualmente de edad superior a los 65 años y con otras enfermedades, permite una evaluación integral y pone de relieve otras enfermedades prevalentes a estas edades y asociadas a la osteoporosis, como la disfunción tiroidea y la gammapatía monoclonal y mieloma. El calcio y el fósforo séricos, y la calciuria, son parámetros que nos pueden orientar hacia la presencia de hiperparatiroidismo, osteomalacia o malabsorción intestinal.

Pruebas de laboratorio más específicas, como niveles de 25 OH vitamina D y PTH-i, electroforesis de orina, testosterona total y libre, estradiol, FSH, LH, prolactina, etc. vendrán indicadas por los hallazgos clínicos o de laboratorio previamente reseñados.

1.3.3 Medición de la masa ósea.

El establecimiento, en los años noventa, por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los criterios densitométricos de osteoporosis elevaron a esta técnica a la categoría de prueba diagnóstica, y durante mucho tiempo ha sido considerada como decisiva. Hoy en día, se contempla como una técnica que ayuda de manera importante al diagnóstico de osteoporosis, pero sin ser definitiva.

Está claro que la disminución de la masa ósea constituye parte de la patogenia de la enfermedad osteoporótica. Así, el mejor predictor de riesgo de fractura en la cadera es la DMO en fémur proximal, pero asimismo puede ser indicativa de alto riesgo de fractura en antebrazo o vértebras; como una DMO baja en columna lumbar o en antebrazo es indicativa además de mayor riesgo de fractura de cadera. Estudios recientes han demostrado que incluso una mayor tasa de pérdida de masa ósea, independientemente de la DMO basal, aumenta el riesgo de fractura en cadera y antebrazo (Kanis JA et al., 2006; Sornay-Rendu E et al., 2005).

1.3.3.1. Aplicaciones de la DXA.

Las utilidades clínicas de la medición de la masa ósea son el diagnóstico de una masa ósea baja (determinar la DMO), la predicción de las fracturas y la vigilancia seriada (Binkley N et al., 2006).

Las localizaciones de la medición deben ser, columna lumbar y fémur proximal (total y la subregión de cuello femoral), aunque también puede considerarse válida la del tercio distal del radio cuando no es posible la determinación de la DMO en las otras dos localizaciones.

Los intervalos entre mediciones no deben ser inferiores a un año (mejor dos), excepto en casos en los que existan circunstancias asociadas a pérdidas rápidas de masa ósea, como el tratamiento corticoideo, en que podrán acortarse. Una vez que la eficacia del tratamiento ha sido establecida, los intervalos se harán cada vez más largos. Al respecto, es importante decir que la eficacia del tratamiento no viene dada exclusivamente por la DMO; efectivamente, los ensayos clínicos realizados en los últimos años con fármacos para la osteoporosis han demostrado una eficacia antifracturaria independientemente del aumento de la masa ósea. Ello está en concordancia con el mecanismo etiopatogénico de la enfermedad, en el cual no sólo participa la cantidad de hueso (es decir, la DMO que es lo que mide la DXA), sino también la calidad ósea (es decir, propiedades del hueso que escapan a la densitometría). Por esto las mediciones seriadas deben ser interpretadas con cautela, y no considerarse que un tratamiento fracasa por el hecho de no aumentar la DMO; aunque si ocurre un incremento de la masa ósea claramente se está produciendo una reducción del riesgo de fractura, y, por tanto, podemos asegurar que el tratamiento esta siendo eficaz (Bonnick SL et al., 2006).

1.3.3.2. Indicaciones de la DXA.

Está claro que no es operativo realizar una densitometría a toda la población para detectar a aquellas personas que tienen osteoporosis o un alto riesgo de fractura; es necesario limitar su uso de tal forma que sea rentable y efectivo, que no se sature realizando mediciones innecesarias a personas de bajo riesgo e impidiendo acceder a ella a aquéllas otras que se van a beneficiar de un tratamiento, para hacer de esta forma un uso correcto de la densitometría incrementando la relación coste-beneficio.

Las últimas recomendaciones de la Sociedad Internacional sobre Densitometría Clínica (ISCD) sobre las indicaciones de una densitometría son (Binkley N et al., 2006):

1. Mujeres de 65 años o mayores.
2. Mujeres posmenopáusicas menores de 65 años con factores de riesgo.
3. Hombres de 70 años o mayores.
4. Adultos con fracturas por fragilidad.
5. Adultos con enfermedades asociadas con baja masa o pérdida óseas.
6. Adultos que tomen fármacos asociados con baja masa o pérdida óseas.
7. Cualquier persona en quien se esté considerando establecer un tratamiento farmacológico para la osteoporosis.
8. Cualquier persona en tratamiento para la osteoporosis, para monitorizar su efecto.

1.3.3.3. Interpretación de la DXA.

Es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones para realizar una correcta interpretación de la DXA. En primer lugar, el empleo de la T-score y los criterios diagnósticos densitométricos de la OMS sólo deben aplicarse a mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 50 años cuyas mediciones hayan sido realizadas con aparatos DXA en columna lumbar y en fémur proximal. La medición del tercio distal de radio podrá ser utilizada para aplicar estos criterios, pero sólo en las circunstancias antes descritas (Binkley et al., 2006).

Para las mujeres antes de la menopausia y hombres menores de 50 años, la ISCD recomienda utilizar la Z-score (aunque hay que tener en cuenta que en las décadas de los 30 y 40 años los T-scores y Z-scores prácticamente coinciden), y en ellos definir como “dentro del rango esperado para su edad” la DMO que se corresponda a una Z-score > -2 , siendo “por debajo del rango esperado para su edad” si la Z-score es ≤ -2 . En este último caso, se puede hacer el diagnóstico de osteoporosis si la baja masa ósea se acompaña de causas secundarias (tratamiento corticoideo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo, etc.). No debe hacerse en ellos basándose exclusivamente en los criterios densitométricos.

Es de gran importancia conocer la población de referencia para aplicar la T y la Z-score. De cualquier forma, la mayor parte de los aparatos DXA llevan en su base de datos los de la población del estudio NHANES III, y es ésta la que se debe utilizar en el caso de querer aplicar la T-score y los criterios de la OMS. Sin embargo, si queremos aplicar la Z-score, es mucho mejor tener la referencia de la población específica local, siempre que ésta exista. Así, en España se realizó un estudio multicéntrico para obtener esos

datos de referencia correspondientes a nuestra población (Diaz Curiel et al., 1997).

Respecto a las mediciones seriadas, hay que tener en cuenta que no se pueden comparar si están realizadas con aparatos de distintas casas comerciales. Por otro lado, es necesario también conocer la precisión específica del aparato, ya que de ella depende la importancia o el valor real que debemos dar a los cambios longitudinales de la DMO. De la misma forma, cuando se esté monitorizando un tratamiento, hay que recordar que la eficacia de los fármacos no depende exclusivamente de la DMO.

Por último, hay que identificar aquellas mediciones que no son válidas, por presencia, por ejemplo de escoliosis importante, osteofitosis lumbar, fracturas en 3 de las 4 primeras vértebras lumbares, prótesis vertebrales lumbares o de fémur proximal, artefactos (enema de bario, calcificaciones superpuestas al área explorada, grapas quirúrgicas, etc.), y que nos obligan a considerar la medición en otra de las localizaciones validadas.

En resumen, la DMO es un buen predictor del riesgo de fractura y permite monitorizar el tratamiento a largo plazo (más de un año). Pero no es el único factor implicado en la resistencia ósea; otros factores han demostrado predecir el riesgo de fractura, independientemente de la DMO (edad, etc.), por lo que hay que tenerlos en cuenta a la hora de evaluar el riesgo de fractura. Los criterios de la OMS son más bien de carácter epidemiológico que realmente diagnóstico, y no son, por otro lado, únicos indicadores de tratamiento ni de la efectividad del mismo.

1.3.4. Evaluación radiológica.

Aunque la radiología es el método más específico para el diagnóstico de la fractura osteoporótica, tiene escasa validez para el diagnóstico de osteoporosis antes de que ocurra la fractura, ya que los signos radiológicos clásicos de osteopenia (aumento de la radiolucidez, resalte de los platillos vertebrales y pérdida de la trabeculación horizontal del cuerpo vertebral) aparecen cuando ya existe una gran pérdida de masa ósea (al menos un 30%), y además son signos de interpretación subjetiva dependientes de las circunstancias técnicas en que se realiza la radiografía (voltaje, dureza del haz, distancia foco-placa...), lo cual también dificulta su reproducibilidad.

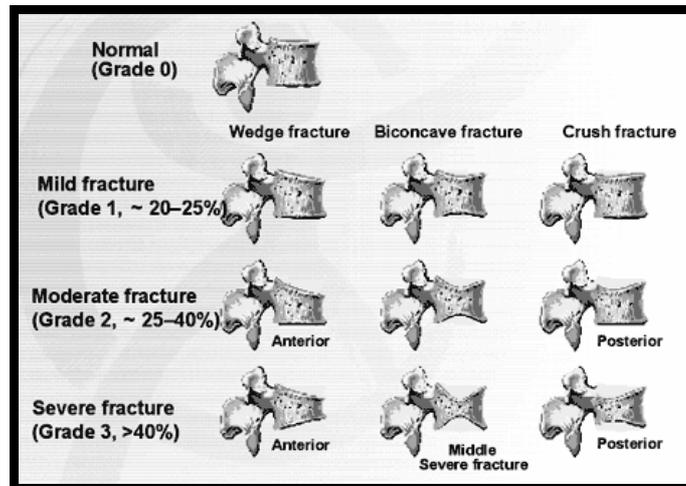
La interpretación de los hallazgos radiográficos depende a menudo de la preparación y motivación del observador, y no existe un “patrón oro” que defina la fractura vertebral (Ferrar L et al., 2005). Hay una amplia variabilidad interindividual en el tamaño y la forma de los cuerpos vertebrales, e incluso debe tenerse en cuenta que cuerpos vertebrales normales pueden mostrar imágenes que induzcan al error, por ejemplo, cuando los mismos son proyectados oblicuamente, como ocurre en los casos de mal posicionamiento de los pacientes en el momento de la realización de la radiografía.

Aún cuando se define la existencia de una deformidad, el siguiente paso es determinar si estos cambios se deben a una fractura osteoporótica verdadera, ya que las deformidades observadas pueden deberse a alteraciones en el desarrollo, a enfermedades degenerativas y neoplásicas o a la enfermedad de Scheuerman. Todas estas posibles causas de deformidad constituyen la principal fuente de falsos positivos en la identificación de las fracturas vertebrales.

Para objetivar lo máximo posible estas deformidades, se recurre a métodos de medición morfométrica de las alturas vertebrales. Tras ser determinados en radiografías laterales de columna (dorsal centrada en D7 y lumbar centrada en L2) los valores medios poblacionales de las alturas anterior, media y posterior de cada vértebra, se establecen unos criterios de deformidad. Los métodos morfométricos más empleados son (Black DM et al., 1995):

1. Método de Eastell, que considera deformidad de grado I cuando se produzca una reducción en una de las alturas anterior, media o posterior mayor de -3 desviaciones estándares del valor medio, y fracturas graves o de grado II a las que están a -4 o más desviaciones estándares de esta media.
2. Método de McCloskey-Kanis. Sigue el criterio anterior, exigiendo además que la altura disminuida lo esté también al menos en -3 desviaciones estándares respecto a un valor de altura posterior predefinida.
3. Método de Genant. Deformidad grado I si la disminución de una o más de las alturas es entre el 20% y el 25% de la media; grado II si es mayor del 25% y grado III si es mayor del 40 %.

Figura 1.3.4.1. Criterios de Genant:



Otro método radiológico de valoración de las deformidades vertebrales es el índice de deformidad espinal (IDE), método semicuantitativo que otorga una puntuación a cada vértebra (desde D4 a L4) de acuerdo con distintas clasificaciones; siendo la más aceptada actualmente la clasificación de Genant: vértebra normal (0 puntos), deformidad grado I (1 punto), deformidad grado II (2 puntos) y deformidad grado III (3 puntos); puntuándose entre un mínimo de 0 y un máximo de 39 puntos.

En resumen, la radiología convencional queda relegada al diagnóstico de las fracturas osteoporóticas o a ser un método que justifique la realización de una densitometría cuando aparezcan los llamados signos radiológicos de osteopenia (debiendo interpretarlos siempre con cautela).

1.3.5. Marcadores bioquímicos de remodelado.

Como resultado de la acción acoplada osteoblástica-osteoclástica, es decir, del remodelado óseo, se liberan una serie de péptidos y proteínas que pueden ser detectados en sangre y orina: son los denominados marcadores bioquímicos de remodelado óseo (MRO) que nos indican de manera indirecta la fisiología (formación/resorción) ósea. Un aumento de dichos marcadores se pondrá de manifiesto ante una situación de recambio óseo acelerado; un incremento de los valores de MRO de resorción traduce un desajuste negativo en el balance del remodelado que llevará a una pérdida ósea, por lo que se considera que es predictivo de dicha pérdida (Stepan JJ et al., 2003).

Además, el remodelado óseo es uno de los factores que participan en la patogenia de la osteoporosis, al ser uno de los elementos determinantes de la calidad ósea, puesto que es el efector de la microarquitectura y el responsable de la reparación de los microdaños; cuando se altera el remodelado óseo se produce una alteración de la calidad ósea, la cual lleva a un aumento de la fragilidad del hueso (Seeman E et al., 2002). Esta participación en la calidad ósea ha sido evidenciada en múltiples estudios prospectivos en los que se ha encontrado una clara relación entre una resorción ósea elevada y un mayor riesgo de fractura, incluso independientemente de la DMO (Gerdhem et al., 2004; Sornay-Rendu et al., 2005).

En los últimos años, diversos ensayos clínicos realizados con fármacos antirresortivos han puesto de manifiesto su eficacia antifracturaria a corto plazo con mínimos aumentos significativos de la DMO, pero sí con cambios ostensibles de los marcadores bioquímicos. Por esto, los

marcadores de remodelado óseo han sido considerados como buenos indicadores de la capacidad terapéutica de los fármacos que actúan a nivel de remodelado óseo, y de la adecuación de unos u otros en función del balance formación/resorción (Delmas PD et al., 2000), por lo que pueden ser empleados para monitorizar la respuesta al tratamiento cuando aún no puede ser utilizada la DXA, es decir, a corto plazo (3-6 meses).

Sin embargo, no está tan claro el papel que desempeñan estos marcadores en el manejo de la osteoporosis en la práctica clínica. Para empezar, ninguno de ellos es específico de la enfermedad. Sólo reflejan una situación fisiopatológica ósea que puede haber sido producida por múltiples causas y en el curso de diversas patologías óseas. Situación que, por otro lado, puede ser transitoria, aunque produzca pérdidas óseas locales lo suficientemente considerables como para deteriorar su resistencia (aumentando así el riesgo de fractura). Pero no está aceptado en absoluto que los MRO puedan ser utilizados para el diagnóstico de osteoporosis.

Tabla 1.3.5.1. Situaciones implicadas en la variabilidad de los marcadores de remodelado.

Edad	Ritmo circadiano
Sexo	Dieta
Estado menopáusico	Ayuno
Lactancia y embarazo	Ejercicio
Fractura reciente	Inmovilización

Dada la variabilidad que los valores de MRO presentan, se hacen de difícil aplicación en los casos individuales de la práctica diaria. En la actualidad, para minimizar la variación analítica la mayoría de los MRO se realizan con autoanalizadores completamente automatizados. Se debe tomar la muestra para la determinación a primera hora de la mañana, antes de las 9:00 horas y tras ayunar toda la noche, y la orina debe ser la primera o segunda de la mañana (Roux C et al., 2005).

Para monitorizar la respuesta al tratamiento en pacientes individualmente y disminuir la variabilidad, se ha sugerido utilizar fórmulas matemáticas, como el “menor cambio significativo” (least significant change –LSD-), aplicable también a la DXA, que define el cambio biológico real debido a la intervención terapéutica en un sujeto determinado después de tener en cuenta las variaciones totales (biológicas y analíticas) de un marcador determinado, así como otros modelos para mejorar la precisión (Lofman O et al., 2005). Una forma más sencilla es determinar dos valores basales y tomar como real el promedio de ambos. Pero no es aceptable que un valor puntual de los MRO puede ser empleado para clasificar a un individuo como afecto de una enfermedad ósea ni establecer la situación de su remodelado óseo.

En resumen, la utilidad de los marcadores de remodelado óseo para valorar la osteoporosis en el contexto de la clínica diaria está en (Srivanka AK et al., 2005; Bonnicksen SL et al., 2006):

- 1- Identificar sujetos con riesgo de pérdida ósea acelerada.
- 2- Valorar el riesgo de fractura.
- 3- Valorar la respuesta al tratamiento anticatabólico a corto plazo.

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 hidroxiapatita, cuya unión a las fibras de colágeno confiere al hueso sus características principales de rigidez, flexibilidad y resistencia (Mundy et al., 2003).

Remodelado óseo es el término con que nos referimos al incesante fenómeno de renovación a que está sometido el hueso. Se lleva a cabo simultáneamente en múltiples unidades microscópicas bien delimitadas dispersas por todo el esqueleto llamadas “unidades básicas de remodelado”. 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. 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. En cada una de ellas el hueso es destruido y después sustituido por otro recién formado (Manolagas et al., 2000; Jilka RL et al., 2003).

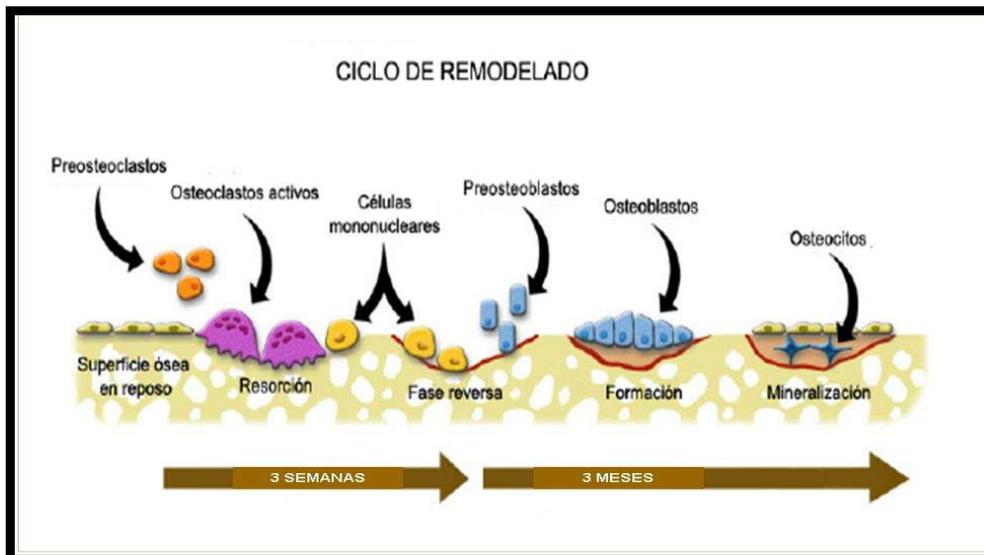
1.4.1. Funciones.

Las principales funciones del fenómeno de remodelación ósea son:

- Sustituir el tejido óseo envejecido o lesionado por tejido nuevo, adaptarlo a las necesidades mecánicas de cada momento (disponiendo las láminas recién formadas en la forma más adecuada). El remodelado no sólo mantiene la masa ósea, sino que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional.
- Contribuir a las necesidades de la homeostasis mineral. Se ha señalado también la posible intervención del fenómeno de remodelación ósea en la regulación del equilibrio ácido-base, a través del comportamiento del hueso como una fuente de bicarbonato. Por otra parte, durante la resorción ósea se liberan factores de crecimiento y citocinas que pueden estar al servicio del normal funcionamiento de la médula ósea.

1.4.2. Fisiopatología.

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

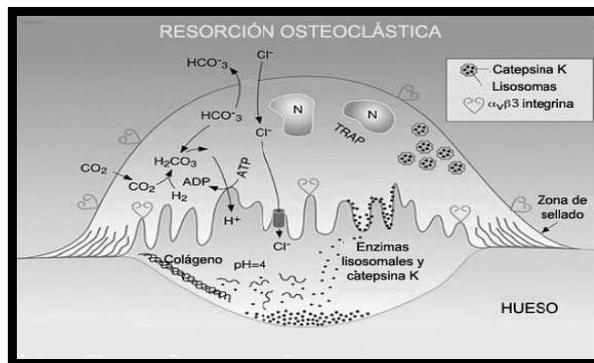
Figura 1.4.1. Fases de remodelado óseo.

La actuación de las unidades de remodelado se inicia con la **activación** de un grupo de osteoclastos en un lugar determinado del esqueleto, que da paso a la resorción ósea. A continuación, y en el mismo lugar, se activan los osteoblastos, reponiendo el hueso destruido por los osteoclastos. La resorción se desarrolla durante tres o cuatro semanas y el de formación durante tres o cuatro meses. Las unidades de remodelación renuevan al cabo del año un 3-4% del hueso cortical y un 25-30% del trabecular. Se calcula que en un momento determinado están activos entre 1,5 y 2 millones de unidades, no sólo en distintos lugares, sino en diferentes momentos funcionales. En el caso del hueso cortical, la actuación celular tiene lugar en el seno del mismo. En el hueso trabecular, el fenómeno ocurre en la superficie en contacto con la médula ósea.

El proceso en las unidades de remodelado comienza con el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos, que proliferan, se diferencian y se fusionan, para formar las grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros. Para que los osteoclastos desarrollen su efecto, las células que recubren el hueso (conocidas como "osteoblastos de

revestimiento” o de reposo), deben retraerse y dejar huecos entre ellas. Tras establecer contacto con la matriz ósea, las células osteocásticas experimentan un proceso de “polarización” en virtud del cual la zona de su membrana por la que se realiza dicho contacto adopta una conformación “rugosa”. Circundando a esta zona rugosa se desarrolla un anillo que sella el espacio que queda entre la zona rugosa y la matriz ósea, aislándolo del microambiente óseo. Los osteoclastos segregan al espacio sellado entre la zona rugosa y la matriz, protones y enzimas proteolíticas (fundamentalmente catepsinas, de las que la más representativa es la catepsina K). La acidificación produce un fenómeno de desmineralización, y posteriormente la matriz desmineralizada es degradada por las enzimas proteolíticas. Es la *fase de resorción* (Boyle WJ et al., 2003).

Fig 1.4.2. Enzimas implicadas en la actividad del osteoclasto.



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

Una vez finalizado el fenómeno de resorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por la presencia de unos pocos fagocitos mononucleares

que, además de limpiar la cavidad, tienen la función de formar la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo. Es la *fase de inversión*, a la que sigue la actuación de los osteoblastos. Se denomina “acoplamiento” a esta “adecuación temporo-espacial” entre la acción de los osteoclastos y la de los osteoblastos. Las señales responsables del mismo no se conocen bien, pero se piensa que pueden consistir en factores de crecimiento que, enterrados en la matriz ósea al formarse la misma, son liberados desde ella cuando es destruida. El más conocido es el factor transformante β (TGF- β). También podría tratarse no ya de sustancias enterradas en la matriz, sino de elementos constituyentes de la propia matriz (Dallas SL et al., 2002).

En la **fase de formación**, los osteoblastos proliferan, se diferencian, y finalmente depositan hueso nuevo, proceso mediado por IGF-1 y BMP-2 (Kawaguchi J et al., 2005), que queda organizado en forma de láminas. En la diferenciación y función de los osteoblastos intervienen diversos factores (Raisz et al., 2005) de los que merecen señalarse en primer término el Cbfa-1, o Runx-2, y el osterix (Osx), que actúa distalmente a aquél. Ambos son necesarios para la diferenciación de los osteoblastos. El Cbfa-1, además, influye sobre el binomio RANKL/OPG. El receptor PPAR γ , al contrario de lo que hace el factor Cbfa-1, desvía precursores de los osteoblastos hacia adipositos. La producción de ligandos de este receptor es estimulada por la lipoxigenasa (Boyle et al., 2003), codificada por el gen *alox15*, cuya inhibición disminuye la pérdida de masa ósea determinada por la ovariectomía. Recientemente se ha reconocido el papel de la proteína 5 relacionada con el receptor LDL (LRP-5), de cuyo gen se han descrito alteraciones en el sentido de ganancia de función, con aumento de masa ósea, y de pérdida, con osteoporosis (síndrome osteoporosis-seudoglioma). La LRP-5 interacciona con el receptor frizzled para permitir la unión a

ambos de un ligando compartido, las proteínas Wnt, y activar la vía de señalización de este nombre. En la actuación de esta vía de señalización está implicada la β catenina en interacción con la BMP-2. La esclerostatina, una sustancia producida por los osteocitos, parece inhibir la diferenciación de las células madre hacia osteoblastos inhibiendo el sistema BMP/Wnt (Winkler et al., 2003).

El hueso recién depositado inicialmente no está mineralizado (hueso osteoide), pero aproximadamente una semana después de la formación de la matriz ósea, precipita en ella hidroxapatita, dando lugar al proceso de *mineralización*. Las láminas se van mineralizando de la profundidad a la superficie, en el mismo orden que fueron depositadas. La mineralización alcanza el 60% de su máximo a las pocas semanas, y después continúa lentamente, durante otros 2-3 años, dando lugar a la denominada mineralización secundaria.

Se considera que aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad, o bien se transforma en osteoblastos de superficie, recubriendo el hueso recién formado (“osteoblastos de revestimiento” o de reposo), o bien, a medida que forman hueso, quedan enterrados en él, transformándose en osteocitos. Estos se mantienen en contacto entre sí y con de la superficie ósea mediante una red de prolongaciones citoplasmáticas alojada en un sistema canalicular existente en el seno del tejido óseo. Esta red parece guardar relación con la capacidad de los osteocitos para enviar a la superficie del hueso señales producidas cuando detectan cambios en las características mecánicas del tejido circundante. Dichas señales pueden determinar que se ponga en marcha un ciclo de renovación. Se ha propuesto que, cuando los osteocitos

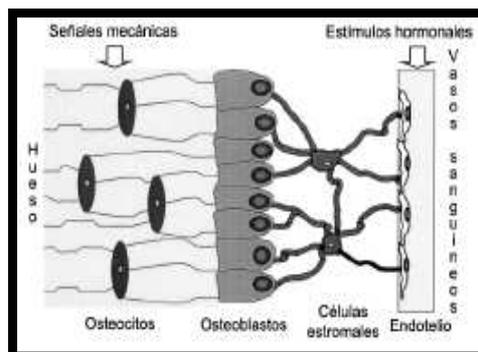
sufren apoptosis, transmiten a través del sistema canalicular señales de reclutamiento y activación osteoclástica (Stains JP et al., 2005).

Tanto los osteoclastos como los osteoblastos se originan en la médula ósea. Los precursores de los osteoclastos son estirpe hematopoyética, mientras que los de los osteoblastos pertenecen al mesénquima (estroma) de la médula.

1.4.3. Regulación del remodelado óseo.

Todos los fenómenos anteriores deben estar regulados. La “activación” de los osteoclastos y el “acoplamiento” de los osteoblastos a los osteoclastos son los puntos clave. La activación marca, entre otras cosas, la velocidad del recambio. Ambos, activación y acoplamiento, están integrados por toda una serie de fenómenos parciales como el reclutamiento del tipo de célula que se trate, su proliferación, su diferenciación y su activación. Cada uno de estos aspectos parciales está regulado independientemente, e incluso en ocasiones, de forma contrapuesta. En condiciones normales, el ciclo vital de las células de remodelación finaliza por apoptosis. La apoptosis también está sometida a regulación (Manolagas et al., 2000).

Figura 1.4.3.1. Interrelación entre los distintos factores implicados en el remodelado óseo.



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 et al., 2002), en la transmisión de estímulos mecánicos entre osteoblastos y osteocitos (Poltkin LJ et al., 2005) y en la regulación de la apoptosis, especialmente en la inducida por bifosfonatos (Plotkin LJ et al., 2002).

El remodelado óseo tiene unos objetivos locales (renovación del hueso deteriorado, adaptación a las necesidades mecánicas) y otros generales (metabólicos). No es de extrañar, por tanto, que en su regulación intervengan mecanismos locales y generales. Los locales son fundamentalmente de dos tipos: mecánicos y humorales (citoquinas y factores de crecimiento). Los generales son de dos tipos: humorales (hormonas) y neurológicos. Los cuatro tipos de factores no actúan de forma independiente, sino que están interconectados entre sí. Por otra parte, se considera que el efecto de todos ellos confluye en una “vía final común”, que actuaría sobre las células efectoras (osteoclastos y osteoblastos), poniendo en marcha mecanismos de señalización celular (Harada S et al 2003).

Tabla 1.4.3.2. Mecanismos de regulación del remodelado:

Factores locales	<i>Mecánicos (mecnostato)</i>	
	<i>Factores humorales locales</i>	Disminuye masa ósea: IL-1, IL-6, TNF, M-CSF, PGE2 Aumenta masa ósea: TGFβ, INFγ, FGF, IGF-1
Factores generales	<i>Humorales</i>	PTH, 1,25 OH ₂ D, calcitonina, GH, hormonas sexuales, hormona tiroidea, leptina
	<i>Sistema nervioso</i>	central y periférico
Vía final común	<i>Sistema OPG/RANK/RANKL</i>	
Receptores, vías de señalización y factores de transcripción	<i>Osteoclastos</i>	RANK, TRAFs, JNK, p38, PIK/Akt, ITAM, NFAT
	<i>Osteoblastos</i>	Cbfa-1/Runx2, Osx, PPARγ/lipooxigenasa 15, Wnt.

Los *factores mecánicos* deben guardar relación con existencia de un “mecnostato”, o sistema capaz de regular la masa ósea en función de la sobrecarga mecánica detectada. El sustrato morfológico o bioquímico no es bien conocido; seguramente está implicado el complejo formado por moléculas de la matriz ósea, la unión de la matriz a las células y unas células a otras, el citoesqueleto citoplasmático y la matriz nuclear (la denominada “matriz histiocelular”). El osteocito es el principal candidato a actuar como sensor del sistema. En respuesta a los estímulos, enviaría órdenes a los osteoblastos de revestimiento, que se retraerían para dejar libre la superficie ósea y atraerían a los precursores de los osteoclastos (Noble BS et al., 2003).

Se considera hoy que el *sistema nervioso central* ejerce una función inhibidora del desarrollo de masa ósea, que lleva a cabo a través del sistema nervioso simpático (de hecho, el bloqueo de éste con bloqueadores beta da lugar a un aumento de masa ósea). Los factores que estimulan al sistema nervioso para que desarrolle esta función no están bien establecidos. El mejor conocido es la leptina (Karsenty G et al., 2006;

Khosla S et al., 2002), hormona secretada por los adipocitos que facilita la acción inhibitoria del sistema nervioso central. Paradójicamente, la hormona tiene el efecto opuesto cuando actúa periféricamente.

Los factores implicados en la regulación de la remodelación mejor conocidos son los humorales (generales u hormonas, y locales o citocinas y factores de crecimiento). Dentro de las hormonas suelen distinguirse las denominadas “hormonas calciotropas” (parathormona [PTH], calcitriol –o 1,25(OH)₂D y calcitonina) y otras que podemos calificar –desde el punto de vista del metabolismo mineral de “inespecíficas”, entre las que se encuentran las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), las hormonas tiroideas, los glucocorticoides, la hormona de crecimiento y la leptina.

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 IL-6 y IL-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). Los osteoclastos, al ser estimulados, ponen en marcha el ciclo de renovación ósea, lo que en virtud del fenómeno de acoplamiento acaba

haciendo intervenir a los osteoblastos. En definitiva, la PTH aumenta el recambio óseo.

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 incluyen el aumento de la absorción intestinal de calcio y la inhibición de la secreción de PTH actuando sobre las paratiroides. Además, facilita 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, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (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.

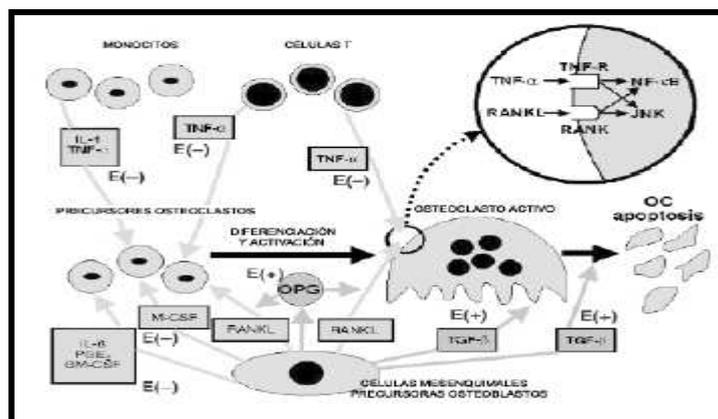
Estrógenos:

Los estrógenos desempeñan un papel fundamental en el metabolismo óseo. Este hecho queda 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, MCSF y TNF α (Linderg MK et al., 2001).

Las células diana para la acción estrogénica contienen concentraciones variables de homodímeros y heterodímeros de una o de las dos especies de receptores estrogénicos—alfa y beta—. El alfa, está presente en osteoblastos y osteoclastos, y el beta, expresado solo por osteoblastos. El receptor alfa actúa casi siempre como activador, mientras que el receptor beta puede inhibir la acción activadora del receptor alfa formando heterodímeros con él. Así, los niveles relativos de expresión de estas dos isoformas del receptor afectarán a la sensibilidad celular a los estrógenos (Brzowski AM et al., 1997; Shiau AK et al., 1998; Riggs L et al., 2003) (Peterson K et al., 2000). Los estrógenos ejercen además sus efectos positivos a través de un efecto paracrina (Manolagas SC et al., 2002).

Figura 1.4.3.3. Efectos paracrinicos de los estrógenos.



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 β 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 et al., 2001). La deficiencia estrogénica incrementa además la apoptosis de los osteocitos (Kousteni S et al., 2001), lo que se ha propuesto que altera la función mecanosensora del sistema canalicular de reparación de microdaños contribuyendo a la fragilidad ósea (Manolagas et al., 2002).

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 citoquinas como sobre proliferación y diferenciación osteoblastica (Khosla SF et al., 2005).

Estudios transversales y prospectivos han demostrado el efecto de los estrógenos en el mantenimiento de la masa ósea en varones. 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, sólo 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 (Khosla S et al., 2002).

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. Existen distintos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* acerca del efecto de los estrógenos sobre el sistema OPG/RANK/RANKL, que aunque con resultados no contundentes, parecen apoya la idea de que los estrógenos inhiben la osteoclastogénesis vía OPG/RANK/RANL (Khosla et al., 2002; Hofbauer et al., 2004).

Andrógenos:

Los principales efectos de los andrógenos tanto en varones como en mujeres son incrementar el tamaño óseo y estimular la formación ósea. La mayoría de los estudios realizados *in vitro* demuestran una estimulación en la proliferación, diferenciación y supervivencia del osteoblasto (Vanderschueren et al., 2004) postulándose además que el escaso efecto sobre el osteoclasto está mediado de forma indirecta por el osteoblasto (Huber DM et al., 2001). La vía efectora de estos efectos se ha propuesto que es un estímulo de TGF β (Vanderschueren D et al., 2004) e IGF-1 (Rucker D et al., 2004), junto a una inhibición de IL-6.

El efecto en la regulación del tamaño óseo es por potenciación de la aposición de hueso sobre la superficie perióstica externa (Vanderschueren D et al., 2006). Además ejercen un efecto indirecto sobre la masa ósea aumentando la masa muscular.

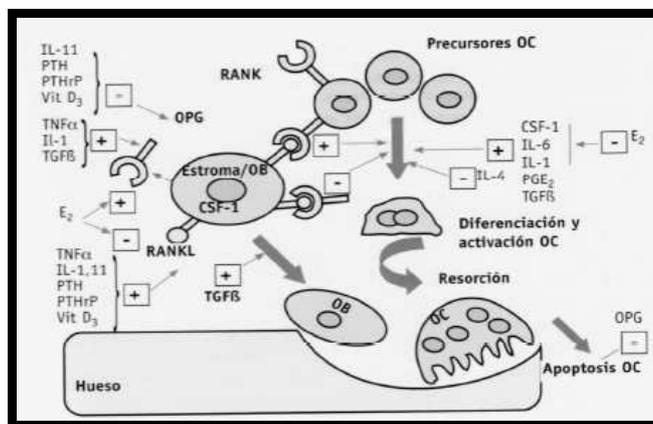
IGF I y proteínas transportadoras:

La secreción de IGF-1 tiene un importante papel en el mantenimiento de la masa ósea en la edad adulta (Muñoz-Torres et al., 2001). 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).

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).

Los **factores locales** reguladores de la remodelación ósea son muy numerosos y constituyen un entramado funcional en el que unos determinan o modifican la acción de otros. En el desarrollo de los osteoclastos se han implicado citocinas y factores estimuladores de colonias. La lista incluye distintas interleucinas (IL-1, IL-6...), el TNF, el factor estimulador de las colonias de monolito-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF), así como la PGE2 y los leucotrienos. El interferón gamma (INF γ) inhibe la osteoclastogénesis.

Figura 1.4.3.4. Efectos de las distintas hormonas y citoquinas a nivel autocrino:



Entre los factores estimuladores de los osteoblastos cuentan el TGF- β , las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF I y II). Los factores que estimulan a los osteoblastos pueden inhibir a los osteoclastos; por ejemplo, el TGF- β parece inducir en los osteoclastos un fenómeno apoptótico, responsable de su desaparición en el foco de resorción, para dar paso a la fase formativa. Por otra parte, el TGF- β inhibe la apoptosis osteoblástica (Raisz LG et al., 2003; Shoback D et al., 2007).

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); 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).

TGF β e INF γ :

TGF β 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 γ ejerce una potente inhibición de la formación de osteoclastos, a la vez que estimula la síntesis de diversas citokinas entre ellas IL 18 (Takayanagi H et al., 2002).

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs):

Son péptidos de la familia del TGF β 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. La leptina, cuando actúa a nivel de sistema nervioso central, determina un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la masa ósea y cuando actúa directamente sobre las células periféricas, da lugar al efecto contrario. Se ha supuesto que su principal función es esta segunda (periférica), y que la primera debe interpretarse como un mecanismo de seguridad para evitar una pérdida de masa ósea excesiva en situaciones de desnutrición grave (al disminuir el inhibidor que desarrolla sobre el sistema nervioso, previniendo la pérdida de masa ósea que de otra forma ocurriría) (Karsenty G et al., 2006).

Su efecto anabólico está mediado por el aumento en la diferenciación osteoblástica, aumenta la síntesis de proteínas de la matriz y reduce su apoptosis (Gozdeladze JO et al., 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 et al., 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.

En los últimos años, se han realizado grandes avances en el conocimiento del mecanismo molecular de la regulación del remodelado óseo, especialmente sobre la relación que existe entre las células óseas; es decir, la relación entre los osteoblastos y sus células precursoras estromales con los precursores hematopoyéticos de los osteoclastos.

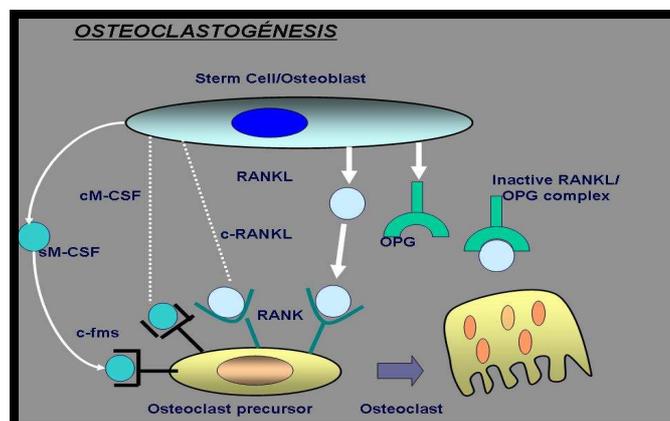
Este conocimiento se inició con el descubrimiento de varios miembros de la familia del TNF, como la osteoprotegerina (OPG), una proteína con una potente actividad inhibitoria de la osteoclastogénesis (Simonet et al., 1997; Yanot al. e, 1999), seguido por el aislamiento del RANKL (un ligando transmembrana expresado en los osteoblastos) y del RANK (un receptor de

las células hematopoyéticas precursoras de los osteoclastos al que se une el RANKL) (Yasuda et al., 1998).

RANKL es una proteína de transmembrana o soluble, producida por las células de la línea estromal-osteoblástica y por los linfocitos T activados, que une el receptor celular RANK, expresado por los osteoclastos y sus precursores, y por las células monocíticas. La OPG es una molécula soluble, también producida por las células de la línea estromal-osteoblástica y por los linfocitos T activados, que actúa como falso receptor de RANKL, impidiendo por ello la interacción de RANKL con RANK.

Estudios de estas moléculas en animales, han confirmado el papel clave a nivel óseo, sistema inmunitario y cardiovascular: los ratones knock-out para RANKL y aquellos knock-out para RANK tienen un fenotipo similar, caracterizado por la osteopretosis con completa ausencia de osteoclastos e falta de los ganglios linfáticos, con anormal desarrollo de linfocitos B y T, mientras que los ratones knock-out para OPG manifiestan grave osteoporosis por aumento de la osteoclastogénesis y desarrollan calcificaciones en las paredes de la aorta y de las arterias renales. (Rogers et al., 2005).

Figura 1.5.1.1. Sistema OPG/RANK/RANKL.

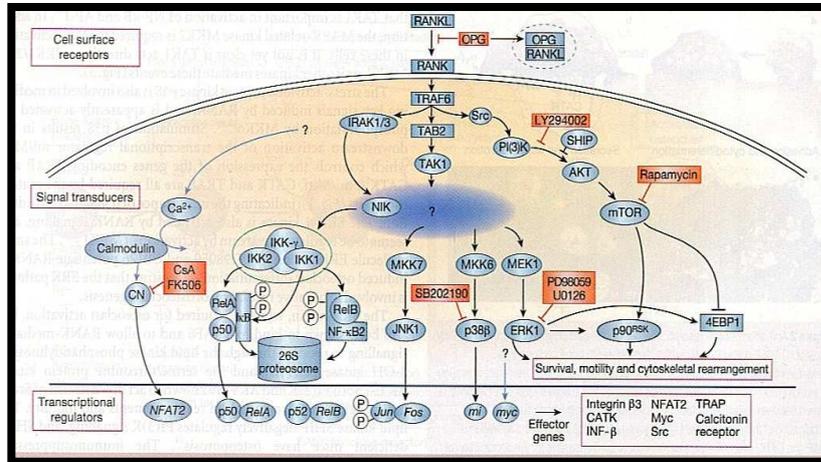


En el microambiente óseo la unión de RANKL con RANK estimula la diferenciación, la fusión, la activación, y la supervivencia de los osteoclastos, con el consiguiente aumento de la reabsorción ósea. La OPG, impidiendo tal unión, produce los efectos opuestos. El balance entre RANKL y OPG representa el principal determinante del número y de la actividad osteoclástica, y la vía final común a la mayor parte de los factores moduladores de la reabsorción ósea.

La forma soluble de RANKL, puede derivar o de “splicing” alternativo de un común pre-RNA, o de la proteólisis de la forma de membrana por metaloproteasas, entre ellas la enzima de conversión del TNF- α . La forma de membrana tiene, al menos en los modelos animales, una mayor actividad biológica respecto a la soluble. Es importante destacar que este sistema requiere la presencia de factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) producido también en células osteoblásticas (Houfbauer LC et al., 2001). CSF-1 y RANKL se requieren conjuntamente para inducir la expresión de los genes que caracterizan al osteoclasto maduro como el de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina y β 3-integrina (Khosla S et al., 2001). El osteoclasto maduro es activado por mensajes que inducen el inicio del remodelado óseo. El osteoclasto se polariza y, en respuesta a la activación de RANK por su ligando, desarrolla cambios estructurales internos (reagrupación del citoesqueleto de actina y formación de una unión estrecha entre la superficie ósea y la membrana basal formando un compartimento sellado) que lo preparan para la resorción ósea. Este compartimento formado es entonces acidificado, mediante la secreción de hidrogeniones, y a continuación se liberan enzimas líticas como TRAP y CATK en la laguna de resorción que completan el proceso (Teitelbaum SL et al., 2000). La

supervivencia del osteoclasto maduro y su participación en sucesivas tandas de resorción ósea es regulada por diversas hormonas y citocinas (Khosla S et al., 2001). De hecho, se ha sugerido que las diferencias de los niveles circulantes de sRANKL en algunas patologías pueden reflejar simplemente las diferencias de los valores de OPG (Rogers A et al., 2005). El RANK activa diversas vías de señalización intracelular (NF κ B –que da nombre al sistema-, JNK, Erk, p38, [3K/Akt, NFAT). El paso clave inicial en la actuación del RANK es la unión de los TRAF (factores citoplasmáticos asociados al TNFR) a lugares específicos de su dominio intracelular. El 6 es el mejor conocido, y actúa como un adaptador para la unión de diversas proteínas de señalización. El osteoblasto produce, además del RANKL, otra sustancia necesaria para la osteoclastogénesis, el M-CSF, que se une al receptor c-fms presente en los precursores de los osteoclastos. La presencia simultánea de RANKL y M-CSF se ha venido considerando suficiente para inducir la formación de osteoclastos, pero hoy se sabe que no es así. Deben activarse también inmunorreceptores vinculados a moléculas adaptadoras que contengan en su cola citoplasmática el motivo ITAM14. Los receptores son el TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells) y el OSCAR (osteoclast-specific activating receptor), y las moléculas adaptadoras a que están vinculados son la DAP12 (DNA activating protein) y la Fc γ R (Fc receptor common gamma Chain). Los ligandos del TREM2 probablemente se encuentran en los propios osteoclastos activados, y los del OSCAR en los osteoblastos, aunque permanecen muchos aspectos por esclarecer en este campo. La coestimulación de la señalización ITAM y del RANK es indispensable para la inducción y activación del factor nuclear de las células T activadas (NFAT), el factor de transcripción principal en la osteoclastogénesis.

Figura 1.5.1.2. Vía de señalización intracelular de la unión RANK/RANKL:



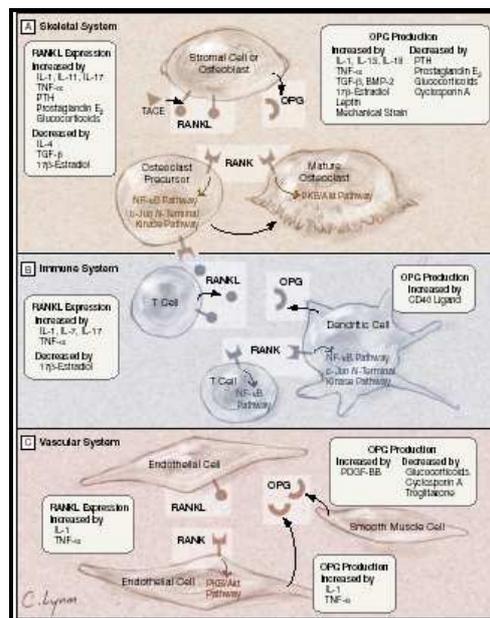
1.5.2. Regulación del sistema OPG/RANKL

La expresión de RANKL y OPG por parte de las células estromales-osteoblásticas está sometida a una compleja modulación endocrina tanto local como sistémica, que involucra todas las principales hormonas y mediadores locales osteotropas; menos notoria, al menos de momento, parece ser la modulación de la expresión de RANK. Así, diversas hormonas, citocinas y péptidos producidos en distintos tejidos modulan el metabolismo óseo mediante la expresión de RANKL en las células óseas (Rogers et al., 2005). Las principales hormonas calciotropas (PTH, PTHrP o calcitriol) y las citocinas proresortivas (IL-1, IL-6, TNF o PGE2) incrementan la expresión de ARNm de RANKL en células osteoblásticas (Zaidi et al., 2003). Sin embargo, el incremento de la osteoclastogénesis inducida por estos factores calciotrópicos, via RANKL, es bloqueada por la acción de la OPG. Además, ciertos fármacos que presentan un efecto deletéreo sobre el metabolismo óseo como son los glucocorticoides y la

ciclosporina A han mostrado capacidad para suprimir la expresión de OPG (Hofbauer et al., 2004). Estos datos indican que el sistema de señalización RANK en osteoclastos integra diversos mensajes humorales que regulan la resorción ósea y la homeostasis cálcica. De gran interés es el hallazgo que considera a los linfocitos T como una importante fuente de RANKL en el hueso. Así, la activación de las células T induce un incremento de la osteoclastogénesis y resorción ósea sugiriendo el mecanismo por el que la inflamación aguda y crónica, y ciertas leucemias, están implicadas en la pérdida ósea patológica. Por otra parte, los factores humorales que inhiben la resorción ósea actúan también modulando el acoplamiento entre osteoblastos y osteoclastos (Rogers et al., 2005). Los estrógenos constituyen el principal inhibidor endógeno de la resorción ósea y su mecanismo de acción se ha explicado por distintos mecanismos aunque no se ha establecido con exactitud el elemento más relevante de sus efectos *in vivo*. Se conoce que los estrógenos reducen el número de osteoclastos *in vivo* suprimiendo, posiblemente la formación de estas células. Así, junto a los documentados efectos inhibitorios sobre citocinas proresortivas (IL-1, IL-6 o TNF- α), se ha descrito una acción sobre los osteoblastos incrementando la producción de OPG e inhibiendo la actividad de RANKL (Bord S et al., 2003). Por ello, el hipoestrogenismo provocaría una elevada producción de varias citoquinas pro-inflamatorias que promueven la osteoclastogénesis (IL-1, IL-6, TNF alfa y M-CSF) y la terapia sustitutiva estrogénica (TSE) tendría el efecto opuesto (Riggs et al., 2002). En estudios previos, se ha tipificado el efecto del tratamiento estrogénico sobre el sistema OPG/RANK/RANKL. En éstos, la terapia hormonal sustitutiva incrementa la producción de OPG en osteoblastos y células del estroma, vía receptor estrogénico alfa (Hofbauer et al., 2004). Además, el hipoestrogenismo aumenta la producción de RANKL en las células óseas, mientras que el reemplazo estrogénico previene estos efectos (Schevde et

al., 1999). En resumen, el hipoestrogenismo provoca un balance óseo negativo al desencadenar una elevada osteoclastogénesis mediada por sobre-expresión del RANKL y represión de OPG. Estos datos son consistentes con los estudios que muestran que el tratamiento con OPG en ratas ovariectomizadas previene la pérdida de masa ósea (Zaidi et al., 2003).

Figura 1.5.2.1. Factores reguladores de OPG y RANKL in vitro: (Rogers A et al., 2005).



1.5.3. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades óseas.

Diversos estudios clínicos han evaluado los niveles circulantes de OPG en una población de sujetos adultos sanos. Se evidencia la existencia de una correlación positiva entre la OPG circulante y la edad, tanto en hombres como en mujeres (Khosla S et al., 2002; Szulz P et al., 2001; Kudlacek S et al., 2003). El dato negativo de Rogers y cols. es posiblemente debido al estrecho intervalo de edad en la población en estudio, y a la mayor variabilidad de los valores circulantes en la población anciana. El aumento con la edad puede reflejar un incremento en la producción de OPG en el

curso de procesos patológicos como la osteoporosis y la aterosclerosis, como también una disminución en el aclaramiento renal.

Del estudio de Khosla y cols. surge además que las mujeres en edad fértil tienen niveles de OPG superiores a los hombres de la misma edad, y que esta diferencia se pierde en la postmenopausia; diferencia sin embargo no está constatada por algunos grupos.

El interés por el papel de las hormonas sexuales en la regulación de los niveles circulantes de OPG se acrecentó por estudios *in vitro* que demostraron que los estrógenos estimulan, mientras que los andrógenos inhiben la expresión osteoblástica de OPG (Hofbauer LC et al., 2001). Los resultados de los estudios clínicos sin embargo son discrepantes.

Tabla 1.5.3.1. Correlación entre OPG y hormonas sexuales en distintos estudios (Dovio et al, 2005).

TABELLA III. Correlazioni tra osteoprotegerina (OPG) e ormoni sessuali.		
Autore	Popolazione in studio	Correlazioni ormoni sessuali e OPG
Arrighi et al. ⁴³ , 2000	160 femmine in postmenopausa	↗↗ E ₁ ed E ₂
Indridason et al. ³² , 2002	209 maschi e 247 femmine (range 40-85 anni)	Maschi: ↗↗ SHBG Femmine: ↘↘ E ₂
Szule et al. ³⁵ , 2001	252 maschi (età media 56 ± 18 anni)	> 40 anni: ↗↗ FTI e FEI ↔ T totale e libero, E ₂ e androstenedione
Khosla et al. ³⁶ , 2002	346 maschi (range 23-90 anni) e 304 femmine (range 21-93 anni)	Maschi > 50 anni: ↘↘ T totale e libero Maschi: ↘↘ E ₂ libero Femmine: ↔
Rogers et al. ³⁹ , 2002	180 femmine in postmenopausa (età mediana 66 anni, range 56-91 anni)	↗↗ E ₂
Kudlacek et al. ³⁹ , 2003	447 maschi (età media 52 ± 13,5 anni, range 24-96 anni) e 687 femmine (età media 50 ± 21 anni, range 19-94 anni)	Maschi: ↗↗ T Femmine: ↘↘ E ₂

E₁ = estrone; E₂ = estradiolo; FEI = free 17β-estradiol index; FTI = free testosterone index; SHBG = sex hormone binding globulin; T = testosterone
↗↗ = correlazione positiva; ↘↘ = correlazione negativa; ↔ = nessuna correlazione.

En población de mujeres sanas de Khosla y cols. no obtuvieron ninguna correlación entre OPG y hormonas sexuales, mientras Kudlacek y cols. e

Indridason y cols. han demostrado una correlación negativa entre la OPG y el estradiol. En mujeres postmenopausicas ha aparecido, en cambio, una correlación positiva con estradiol (Rogers A et al., 2002) y estrona (Arrigi H et al., 2000). En el hombre, Szulc y cols. han encontrado una correlación positiva entre los índices de testosterona y estradiol libre y OPG en sujetos >40 años. Al contrario, Khosla y cols. han demostrado una correlación negativa entre estrógenos (estradiol libre) y andrógenos (testosterona total y libre) por una parte, y OPG. Finalmente, Kudlacek y cols. han observado una correlación positiva con la testosterona.

La disparidad de los datos puede ser debido a la diversidad de los métodos analíticos (medición de la OPG y de los esteroides sexuales), además es importante subrayar la correlación débil obtenida en los estudios. Es posible que las la diversas acciones de las hormonas sexuales en los diferentes tejidos que producen OPG produzcan los efectos no apreciables en los niveles circulantes.

Considerando el papel clave del sistema RANKL/RANK/OPG en la regulación de la osteoclastogénesis, los estudios han buscado la presencia de correlación entre los niveles séricos de OPG y el metabolismo óseo, estudiado a través de técnicas densitométricas y marcadores de remodelado. Los primeros resultados, resultaron paradójicos: los niveles séricos de OPG resultaban de hecho superiores en las mujeres osteoporóticas respecto a una población de mujeres mayores no osteoporóticas, en el grupo de las pacientes osteoporóticas eran además superiores en aquellas con antecedentes personales de fracturas vertebrales no traumáticas. Coherentemente con estos primeros resultados, algunos estudios han obtenido en las mujeres postmenopausicas una correlación inversa entre los niveles de OPG y la DMO en distintos lugares (Rogers A

et al., 2002). Otros, en cambio, han encontrado correlación positiva entre OPG y DMO (Khosla S et al., 2002; Browner WS et al., 2001). Aunque en los hombres se ha obtenido o bien ninguna correlación o una débil correlación inversa (Khosla S et al., 2002; Idridason OS et al., 2005). El hallazgo de una correlación inversa se ha interpretado de manera concordante como expresión de un mecanismo compensatorio inadecuado, y no ha impedido la realización de un ensayo clínico en el que la administración subcutánea de OPG (dosis máx de 3mg/kg) en mujeres en postmenopausia ha determinado una rápida, significativa y prolongada reducción de la reabsorción ósea (Bekker PJ et al., 2001).

Los resultados sobre la existencia de correlación entre los niveles de OPG y los diversos marcadores del metabolismo óseo difieren, dependiendo del sexo y la edad de la población en estudio, así como de la analítica considerada; queda resumido en la tabla 1.5.3.2.. La hipótesis del “aumento compensatorio” se ha formulado para explicar la aparición frecuente de una correlación positiva entre niveles circulantes de OPG y marcadores de reabsorción.

Tabla 1.5.3.2. Correlación entre OPG y distintos parámetros de metabolismo mineral. (Dovio et al, 2005)

TABELLA IV. Correlazioni tra osteoprotegerina (OPG), densità minerale ossea (BMD) e marcatori del metabolismo osseo.

Autore	Popolazione in studio	Siti valutati	Correlazioni BMD e OPG	Correlazioni marcatori ossei e OPG	Metodica di dosaggio OPG
Yano et al. ³⁹ , 1999	Femmine in postmenopausa: 73 osteoporotiche (età media 68,2 ± 7,7 anni), 39 osteoprotiche (età media 66,6 ± 9,2 anni) e 38 controlli sani (età media 67,1 ± 8,6 anni)	Colonna, total body	% L-BMD e th-BMD	Osteoprotiche: % ALP ossea, uPyr, uPyr/Creatinina; % ALP ossea, uPyr, uPyr/Creatinina e BGP	In house
Arrighi et al. ⁴⁰ , 2000	168 femmine in postmenopausa	nr	% fu-BMD	-	nr
Sanki et al. ⁴¹ , 2001	252 maschi (età media 56 ± 18 anni)	Colonna, femore, total body, radio*	↔	> 40 anni: % uPyr (totale e libera), PTH ↔ BGP, ALP ossea, PINP e 25(OH)D	Immunoassay
Browner et al. ⁴² , 2001	498 femmine (< 65 anni)	Radio*, calcagno*, colonna, femore	↔	% BGP, % sCa, PTH	Amgen
Indulskan et al. ⁴³ , 2002	209 maschi e 247 femmine (range 40-85 anni)	nr	Maschi: % fu-BMD Femmine: % BMD	Maschi: % ALP, TRAP, sCa; PTH Femmine: % ALP, BGP, collagen crosslaps; PTH	Immunoassay Biochemica
Sciarone et al. ⁴⁴ , 2002	84 femmine in postmenopausa (età media 78 anni, range 61-97 anni)	nr	% fu-BMD e th-BMD	% PTH, ICTP, sNTX	nr
Khosla et al. ⁴⁵ , 2002	346 maschi (range 25-98 anni) e 384 femmine (range 21-93 anni)	Colonna, collo femorale, radio	Maschi: % fu-BMD Maschi < 50 anni: % L-BMD Femmine: ↔	Maschi > 50 anni: % uNTX e uPyr (libera) Maschi < 50 anni: % ALP ossea Femmine: ↔	Amgen
Regier et al. ⁴⁶ , 2002	188 femmine in postmenopausa (età media 69 anni, range 56-91 anni)	Colonna, femore e collo femorale, total body	% th-BMD, fu-BMD, fu-BMD per sito aggiustamento per età e BMI	% ALP ossea e sCTX ↔ uNTX e uPyr (libera)	Immunoassay
Kudrack et al. ⁴⁷ , 2003	447 maschi (età media 52 ± 13,5 anni, range 24-90) e 687 femmine (età media 50 ± 21 anni, range 19-94)	Colonna, femore, collo e trocantere femorale	Maschi: ↔ Femmine: % fu-BMD	% PTH, % sCa ↔ ALP, 25(OH)D solo femmine: % 1,25(OH) ₂ D	Immunoassay Biochemica
Fahleiner-Pammer et al. ⁴⁸ , 2003	177 femmine sane (range 17-85 anni), 48 femmine osteoporotiche (età media 71 ± 5 anni)	nr	Sane: ↔	Sane: ↔ Osteoporotiche: % sCTX e BGP	nr

ALP = fosfatasi alcalina; BGP = osteocalcina; fu-BMD = densità minerale ossea femorale fu-BMD = densità minerale ossea collo femorale; th-BMD = densità minerale ossea totale; nr = non riportato; 25(OH)D = 25 idrossi vitamina D; 1,25(OH)₂D = 1,25 diidrossi vitamina D; PINP = propeptide N-terminale del collagene di tipo I; PTH = paratormone; th-BMD = densità minerale ossea totale; sCa = calcio sierico; sCTX = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I sierico; uNTX = telopeptide N-terminale del collagene di tipo I sierico; th-BMD = densità minerale ossea total body; TRAP = tartrate resistant acid phosphatase; uPyr = deossipiridinolium urinario; uNTX = telopeptide N-terminale del collagene di tipo I urinario; uPyr = piridinolium urinario; % = correlazione positiva; % = correlazione negativa; ↔ = nessuna correlazione.
* valutazioni effettuate con single energy X-ray o single photon absorptiometry; in tutti gli altri casi la mineralizzazione è stata effettuata con dual energy X-ray absorptiometry; * dati desunti dal sommario in lingua inglese dell'articolo in tedesco.

La discrepancia de los resultados sobre los niveles de OPG, DMO y marcadores de remodelado, puede ser debida a la diversidad de la población en estudio y de los métodos para medirlos, aunque también denota la multiplicidad de tejidos productores de OPG.

1.5.4. Contribución del sistema OPG-RANKL en enfermedades extraóseas.

Patología cardiovascular.

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 asociaron 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 HbA1c (Knudsen ST et al., 2003). Los niveles de OPG estaban elevados sólo 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.

Enfermedades inflamatorias óseas.

La mayor parte de las secuelas esqueléticas de la artritis reumatoidea como las corrosiones periarticulares son resultado de la osteoporosis juxta-articular por un proceso de resorción aumentada por un ambiente inflamatorio en el que se ven envueltos distintas células (Linfocitos T y B, macrófagos), y citoquinas (IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, TNF). Dado que se expresan altos niveles de RANKL, los linfocitos T activados tienen la habilidad de modular las células dendríticas y activar al osteoclasto.

Basado en modelos animales de artritis reumatoidea, las citoquinas regulan la expresión de RANKL y OPG (Lubberts E et al., 2003). Así, por ejemplo, mientras IL-1, IL-7, e IL-17 aumentan la proporción de RANKL/OPG, IL-4 inhibe IL-17 y RANKL. El tratamiento de pacientes con artritis reumatoidea con anticuerpo monoclonal anti TNF-alfa normalizó los niveles séricos de RANKL y OPG (Ziolkowska M et al., 2002). Un papel similar, como el mediador de pérdida del hueso, se ha atribuido a RANKL en los pacientes con espondilitis anquilosante y artritis psoriásica, y en modelos animales de artritis séptica e infección periodontal.

El bloqueo de RANKL previno la destrucción ósea en ratas con artritis. Estudios posteriores en animales de experimentación han combinado el bloqueo de RANKL IL-1 y anticuerpos anti TNF- α . Esta terapia combinada previno la pérdida de hueso y la inflamación periarticular, avalando la posibilidad de bloqueo combinado o secuencial de estas citoquinas (Zwerina J et al., 2004).

Mieloma.

Las lesiones osteolíticas y la hipercalcemia son sellos clínicos del mieloma. Las células del mieloma aumentan la expresión de RANKL y suprimen la producción de OPG por las células estromales mesenquimales (las células precursoras de osteoblastos) a través de interacciones del célula-célula o secreción de dickkopf-1 (un inhibidor de diferenciación del osteoblasto) (Sezer O et al., 2003). La proporción de RANKL/OPG elevada resultante promueve diferenciación del osteoclasto y activación en las áreas adyacentes al mieloma (Giuliani N et al., 2001). Además las células del mieloma expresan RANKL, y la inmunoreactividad del RANKL se pone en correlación positivamente con el número de lesiones osteolíticas (Heider U et al., 2003). La expresión de proteoglicano syndecan-1 en la superficie celular permite las células del mieloma al internalizar y degradar OPG dentro del lisosomas (Standal T et al., 2002). Este mecanismo lleva a la inactivación local de OPG y contribuye a la disminución de los niveles de OPG en suero que es insuficiente contrarrestar los niveles de RANKL soluble (Seidel C et al., 2002).

Las Metástasis esqueléticas e Hipercalcemia Humoral Maligna.

Las células tumorales usan citoquinas locales para estimular a los osteoclastos como mecanismo de acción. Varios tumores malignos con predilección por el hueso (cáncer de mama, cáncer de próstata, neuroblastoma) expresan RANKL, o secretan una forma de RANKL soluble o estimulan las células estromales de la médula ósea aumentando el ratio RANKL/OPG (Brown et al., 2001). De igual manera, la hipercalcemia humoral maligna debida a la secreción de PTHrp por las células tumorales

aumenta la proporción de RANKL/OPG en el microambiente óseo o la secreción de RANKL soluble por las células tumorales. *In vitro*, la OPG parece actuar como un factor de supervivencia en algunos tumores malignos que pueden relacionarse a ligar y neutralización de TRAIL, un inductor importante de apoptosis (Holden I et al., 2002).

Perspectivas futuras del sistema OPG/RANK/RANKL.

Denosumab (previamente conocido como AMG 162) es un anticuerpo monoclonal humano específico contra RANK. Denosumab está siendo estudiado en un amplio abanico de condiciones, que incluyen la osteoporosis, la pérdida de hueso inducida por el tratamiento, artritis reumatoide, metástasis óseas y el mieloma múltiple (Hamdy NA et al., 2007).

Denosumab aumenta la densidad ósea y disminuye la resorción ósea de acuerdo a un estudio publicado recientemente. Un total de 412 mujeres posmenopáusicas con densidad mineral ósea (DMO), baja, definida como un T score de -1.8 a -4.0 en la columna lumbar y de -1.8 a -3.5 en el fémur proximal, recibieron denosumab subcutáneo de una a tres dosis cada tres meses (6, 14, o 30 mg.) o seis meses (14, 60, 100, o 200 mg.); alendronato oral 30 mg. semanales; o placebo en tabletas. La edad promedio de las participantes fue de 63 años; 85% fueron blancas y 11% hispanas y 3% negras. El objetivo primario fue el porcentaje de cambio en la DMO en la columna lumbar a los doce meses. El recambio óseo se determinó midiendo telopéptidos séricos y urinarios y fosfatasa alcalina específica del hueso. Las inyecciones de denosumab aumentaron la DMO de la columna lumbar en un 3% a 6%, mientras el alendronato y placebo se asociaron con un aumento del 4.6% y una pérdida de 0.8% respectivamente. La DMO de la

cadera total aumentó de 1.9% a 3.6% con denosumab, comparado con un aumento del 2.1% con alendronato y una pérdida de 0.6% con placebo. Los marcadores séricos y urinarios indicaron que la supresión de resorción ósea ocurrió dentro de los tres días de la inyección de denosumab, y que la duración de esta supresión fue dosis dependiente. Con relación a los efectos adversos, el denosumab parece bien tolerado. La observación más importante fue la alta ocurrencia de dispepsia con alendronato que con denosumab o placebo (Schwartzman J et al., 2006).

Las complicaciones esqueléticas del cáncer de próstata con metástasis óseas pueden reducirse con fármacos como los bifosfonatos que disminuyen el recambio óseo. En un estudio de fase II se han comparado el ácido zoledrónico y el denosumab en pacientes con cáncer de próstata, metástasis óseas en más de dos localizaciones y una concentración elevada del marcador de recambio óseo telopéptido-N urinario (uNTx) que habían sido tratados previamente con ácido zoledrónico. Se han presentado los resultados de un análisis preliminar de 24 pacientes en la semana 13. El 69% de los pacientes tratados con denosumab y el 38% de los tratados con ácido zoledrónico mostraron un uNTZ inferior a 50 nmol/mol/Cr. No hubo efectos adversos graves relacionados con el tratamiento. Se está llevando a cabo un estudio de fase III del denosumab en pacientes con metástasis óseas.

1.6. Marcadores bioquímicos de remodelado.

El hueso es un tejido metabólicamente activo que experimenta un remodelado continuo. El remodelado óseo es un proceso que depende en gran medida de la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. En

condiciones normales, la formación y la resorción de hueso están acopladas entre sí, y el mantenimiento del equilibrio esquelético a largo plazo se logra merced a la acción de hormonas sistémicas y mediadores locales. Por el contrario, las enfermedades metabólicas óseas, los estados de aumento o de disminución de la movilidad y las intervenciones terapéuticas se caracterizan por desequilibrios más o menos pronunciados del recambio óseo.

En los últimos años, el aislamiento y la caracterización de los componentes celulares y extracelulares de la matriz esquelética ha logrado el desarrollo de marcadores bioquímicos que reflejan de forma específica la formación de hueso o la resorción del mismo. Estos índices bioquímicos han enriquecido notablemente el espectro de análisis empleados en la valoración de la patología esquelética. Son incruentos, comparativamente baratos y, cuando se aplican e interpretan de forma correcta, constituyen herramientas útiles en la valoración de la enfermedad ósea metabólica.

Los marcadores séricos y urinarios del recambio óseo incluyen tanto enzimas de origen celular como péptidos no enzimáticos, pero se clasifican habitualmente según el proceso metabólico que reflejan. Es decir, los marcadores de formación ósea se distinguen de los índices de resorción a efectos clínicos.

La mayoría de los marcadores también están presentes en otros tejidos diferentes del hueso y por tanto, pueden estar sujetos a la influencia de procesos extraesqueléticos. Habitualmente las variaciones de los marcadores óseos no son específicas de enfermedad, sino que reflejan alteraciones del metabolismo esquelético, con independencia de la causa subyacente. A pesar de estas tendencias generales, no son útiles en el

diagnóstico de osteoporosis debido a que los valores en sujetos sanos y pacientes con osteoporosis se solapan sustancialmente. Además, la utilidad de diagnóstico de una sola medida está limitada, ya que todos ellos presentan variaciones en cuanto a la estación, ritmo circadiano, ciclo menstrual, factores dietéticos, etc. Por ello, su empleo en la práctica clínica y su utilidad como diagnóstico de osteoporosis, es limitado.

Las características ideales que debería cumplir un marcador de remodelado óseo son:

- 1) Determinación no invasiva.
- 2) Facilidad de recogida de la muestra.
- 3) Ser un producto específico del metabolismo óseo.
- 4) Mostrar correlación con técnicas de referencia en el análisis del remodelado (histomorfometría ósea, biopsia ósea tras doble marcado con tetraciclina, estudios isotópicos con calcio marcado, absorciometría dual de rayos X).
- 5) Responder al tratamiento específico de enfermedades que afecten al metabolismo óseo.

El proceso de resorción ósea origina la liberación de su contenido mineral y la degradación de la matriz proteica. De igual forma, en la síntesis y mineralización del tejido óseo se liberan sustancias enzimáticas y fragmentos derivados del procesamiento del colágeno que son integrados al

torrente circulatorio y pueden ser determinados como índices de remodelado óseo. La matriz osteoide está formada principalmente por colágeno (90%), otras proteínas de pequeño tamaño y proteoglicanos. La proteína estructural ósea más importante es el colágeno tipo I, formado por dos cadenas α -1 y una cadena α -2, que tras entrelazarse en el osteoblasto para formar el procolágeno, son secretadas al espacio extracelular. Una vez secretadas las moléculas de procolágeno, los péptidos amino (Procollagen type I amino-terminal propeptide; PINP) y carboxiterminales (Procollagen type I carboxi-terminal propeptide; PICP) son escindidos por peptidasas específicas. Las moléculas de colágeno resultantes se unen mediante un elevado número de puentes cruzados intra y extramoleculares (crosslinks), que le confieren elevada insolubilidad y resistencia, a diferencia de las fibras colágenas de otros tejidos. Estos enlaces de estructura piridinólica resistentes a la degradación osteoclástica se liberan de la matriz proteica durante la resorción ósea. Los productos circulantes derivados de estos enlaces piridinólicos son de tamaño variable, desde aminoácidos libres (Hidroxiprolina; OHP, Hidroxilisina; OHL), residuos de piridolina (Pyr) y deoxipiridolina (D-Pyr), telopéptidos del extremo carboxiterminal del colágeno tipo I (Cross-linked C-telopeptide; CTX, C-Terminal telopeptide of type I collagen; ICTP) o aminoterminal (Cross-linked N-telopeptide; NTX).

En resumen, los péptidos derivados del colágeno que podemos determinar son el resultado de la síntesis osteoblástica (PICP y PINP) o productos resultantes de la degradación osteoclástica (OHP, OHL, Pyr, D-Pyr, ICTP, CTX y NTX). El resto de los marcadores de remodelado óseo no están directamente relacionados con el metabolismo del colágeno. La osteocalcina (OC) es una proteína de pequeño tamaño sintetizada por el osteoblasto que se integra en la matriz ósea, pasando en parte al torrente

circulatorio. Otros marcadores de remodelado son sustancias enzimáticas derivadas de la actividad osteoblástica, como la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (bone alkaline phosphatase, b ALP), o de la actividad osteoclástica como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP).

FORMACIÓN	RESORCIÓN
Fosfatasa alcalina total (t ALP)	Piridolina y Deoxipiridolina (PYD, DPP)
Fosfatasa alcalina ósea (b ALP)	Telopéptidos amino y
Osteocalcina (OC)	carboxiterminal del procolágeno tipo I (NTX; CTX)
Propéptido amino y carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP, PINP)	Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)

Variabilidad de las mediciones de marcadores óseos.

Para interpretar con sentido los resultados analíticos siempre se deben tomar en consideración las posibles fuentes de variabilidad inespecífica. En general la variabilidad inespecífica comprende tanto factores preanalíticos (en su mayoría relacionados con el sujeto: (CV_p) como analíticos (fundamentalmente relacionados con el análisis: (CV_a). Se considera que la variabilidad total es la suma de la variabilidad preanalítica y analítica y se define como $CV_t^2 = CV_p^2 + CV_a^2$

El marcador y la determinación ideales se caracterizan por un rendimiento analítico excelente (alta precisión y exactitud), y una variabilidad preanalítica mínima y predecible. Desgraciadamente, ningún método de bioquímica clínica cumple todos estos criterios.

Efectos de la menopausia y el envejecimiento sobre los marcadores de remodelado óseo.

Una vez que cesa el crecimiento somático, las concentraciones séricas y urinarias de la mayor parte de los marcadores óseos vuelven a un nivel algo más bajo que el que se observa durante la pubertad y el crecimiento normales. Esta estabilización suele ocurrir durante el tercer decenio de vida y, en los varones sanos, los niveles de prácticamente todos los marcadores permanecen más o menos invariables hasta la edad de 70 años. Después de esto, se suele observar un ligero incremento en los marcadores de formación como la fosfatasa alcalina ósea o la osteocalcina, y en la mayoría de los marcadores de resorción (Seibel M et al., 2003). Por el contrario, la menopausia normal se acompaña de una sustancial aceleración del recambio óseo, que encuentra su reflejo en un incremento del 50% al 100% tanto en los marcadores de formación ósea como en los de resorción (Midtby M et al., 2001). En mujeres, este incremento del recambio óseo puede atenuarse por los suplementos de calcio (Hla MM et al., 2001). Un estudio prospectivo que abarca la transición perimenopáusica en mujeres sanas sugiere que las variaciones del recambio óseo comienzan durante la premenopausia tardía con una disminución de la formación de hueso, que sólo más tarde va seguida de un incremento de la resorción (Seifert-Klauss V et al., 2002). Se acepta en la actualidad generalmente que la pérdida ósea acelerada que se ve después de la menopausia se debe fundamentalmente a un desacoplamiento en el recambio óseo y a un aumento de la resorción

ósea. Los estudios que emplean marcadores óseos específicos indican que el recambio óseo sigue incrementándose (y asociándose pérdida de hueso) incluso durante la menopausia tardía (Seibel M et al., 2003).

Marcadores bioquímicos del recambio óseo en la osteoporosis.

Abundantes estudios experimentales, preclínicos y clínicos han demostrado que los marcadores de la formación y resorción constituyen herramientas válidas para valorar la respuesta del esqueleto a numerosas influencias.

Empleando los datos de grandes ensayos clínicos epidemiológicos y terapéuticos, se encontró que algunos marcadores del recambio óseo son parámetros de predicción de la pérdida ósea y del riesgo de fractura osteoporótica. En general, los grupos de pacientes con recambio óseo acelerado no sólo pierden hueso a mayor velocidad, sino que también están sometidos a un importante riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales. Por tanto, en grandes estudios de cohortes determinados marcadores bioquímicos parecen identificar grupos con mayor riesgo de fractura (Bonnick SL et al., 2006).

Otros ensayos clínicos han sugerido que se pueden emplear los marcadores óseos para predecir o vigilar la respuesta al tratamiento o el cumplimiento del mismo en pacientes concretos. De acuerdo con estos estudios, la medición del recambio óseo no solamente puede resultar útil para la toma de decisiones terapéuticas, sino que también puede ayudar a reducir costes identificando pacientes que no responden. Sin embargo, el empleo de los marcadores óseos en pacientes individuales no está exento de dificultades.

Usos clínicos de los marcadores en la osteoporosis.

Marcadores bioquímicos en el diagnóstico de osteoporosis.

La osteoporosis es una enfermedad heterogénea. Por tanto, no resulta sorprendente que en los pacientes no tratados con osteoporosis postmenopáusica manifiesta u osteoporosis relacionada con la edad, las velocidades de recambio óseo tiendan a variar dentro de una extensa gama.

Aunque la mayoría de los estudios transversales muestran un recambio óseo acelerado en una determinada proporción de mujeres posmenopáusicas osteoporóticas, habitualmente existe un alto grado de superposición entre las poblaciones enfermas y sanas. Por esto, ninguno de los principales marcadores bioquímicos del recambio óseo proporciona información diagnóstica suficiente para resultar útil en la detección sistemática de la osteopenia vertebral o la osteoporosis. Estudios retrospectivos basados en la población, han demostrado que los antecedentes de fractura se asociaban a recambio óseo anormal.

Tomados en conjunto, los estudios sugieren que un desequilibrio del metabolismo óseo a largo plazo, con un descenso de la formación de hueso y una resorción ósea normal o aumentada puede llevar a un aumento de la fragilidad. Esto, unido al hecho de que el alto recambio óseo se puede mantener durante largos períodos y que la pérdida ósea puede aumentar con la edad, proporciona el fundamento para un diseño de estrategias de intervención más eficaces. Sin embargo, otros factores como la edad, la medicación, la inmovilización y la propia fractura también influyen sobre el metabolismo óseo y, por tanto, es necesario considerarlos al interpretar los datos bioquímicos y su utilización en pacientes concretos (Bonnick SL et al., 2006).

Predicción de la pérdida ósea.

La masa ósea, las tasas de pérdida ósea y el riesgo de fracturas osteoporóticas están relacionados entre sí y se ha demostrado que tanto una escasa masa ósea como una pérdida rápida de hueso constituyen parámetros independientes de predicción del futuro riesgo de fractura (Miller PD et al., 2005). La velocidad de pérdida ósea está determinada por varios factores, uno de los cuales es la velocidad de remodelado óseo. Estudios ya clásicos demostraron que la formación ósea y la resorción se incrementaban poco después de la menopausia natural, una fase que en la mayoría de las mujeres también se asocia a una pérdida ósea significativamente acelerada. Se habían realizado observaciones similares en mujeres premenopáusicas ovariectomizadas y en varones castrados. A la inversa, los marcadores del metabolismo óseo regresan a los niveles premenopáusicos cuando se instaura la terapia hormonal sustitutiva.

Algunos estudios transversales realizados en mujeres en la postmenopausia temprana y tardía han demostrado que existe una correlación negativa entre la masa ósea y las velocidades de resorción y de formación ósea (Miller PD et al., 2006). Aunque se observaron las correlaciones mayores entre los marcadores de resorción ósea y la DMO total, las asociaciones eran menores cuando se calculaban para las mediciones en localizaciones concretas (la columna, la cadera y el radio). Esta diferencia se debe a que los marcadores bioquímicos del recambio óseo reflejan las alteraciones metabólicas de la totalidad del esqueleto, no localizaciones esqueléticas específicas. En la mayoría de los estudios, la correlación inversa entre el metabolismo óseo y la pérdida ósea aumenta con el tiempo transcurrido desde la menopausia. Por tanto, en las mujeres en las que han pasado más

de 20 años de la menopausia, hasta el 52 % de la varianza de la DMO se podría explicar por alteraciones del recambio óseo. Estas relaciones son menos pronunciadas, pero todavía están presentes, en mujeres con menopausia reciente, pero no parecen existir en mujeres premenopáusicas (Seibel MJ. et al., 2003).

Christiansen y cols. demostraron que la medición combinada de la fosfatasa alcalina sérica total, la osteocalcina, el calcio urinario en ayunas, la hidroxiprolina o la DPD pueden predecir el 60-70% de la variabilidad de la pérdida ósea. Estos estudios también demostraron que la correlación entre los marcadores iniciales del recambio óseo y la velocidad posterior de pérdida ósea en la postmenopausia probablemente son congruentes a lo largo de un período de al menos 12 años.

Tomada en conjunto, existe evidencia viable de que las velocidades de remodelado óseo predicen la futura pérdida ósea. Sin embargo, la fuerza de esta asociación parece depender de varios factores, como la edad de la menopausia, la localización del esqueleto y el sexo. No está claro si los marcadores de recambio óseo son capaces de identificar de forma individual (en el contexto clínico) los “perdedores” de hueso rápidos. Sigue abierta la cuestión respecto a si el uso combinado de la DMO y las mediciones de marcadores se convertirá en un estándar en la valoración del riesgo individual.

Predicción del riesgo de fractura.

La masa ósea no es el único determinante de las fracturas esqueléticas. Otros determinantes de la microarquitectura del esqueleto, que no

necesariamente se reflejan en las mediciones de masa ósea, como pueden ser la conectividad trabecular o el número de lugares de remodelado óseo, también contribuyen a la resistencia de los huesos. Por tanto, el recambio óseo puede ser un parámetro independiente de predicción del riesgo de fractura. El análisis de los datos de varios ensayos clínicos sugiere que en las mujeres osteoporóticas tratadas con placebo, la tasa de fractura vertebral aumenta en función directa del recambio óseo o de la disminución de la DMO vertebral. Por tanto, a un determinado nivel de DMO vertebral la tasa de fracturas vertebrales aumenta con la velocidad del recambio óseo. Sin embargo, cuando el recambio óseo es normal el principal determinante de las fracturas vertebrales es la DMO vertebral (Srivastava AK et al., 2005).

Los datos de varios grandes estudios prospectivos independientes indican que en las mujeres posmenopáusicas las tasas elevadas de resorción ósea se asocian a un aumento del riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales, con independencia de la DMO, de la edad y de la discapacidad. Todas las asociaciones se demostraron en grandes grupos de mujeres posmenopáusicas, y está por confirmar si siguen siendo verdaderas en pacientes individuales y en ambos sexos. Sin embargo cabe anticipar que en el futuro los marcadores del recambio óseo desempeñarán un papel tanto en la valoración del riesgo de fractura como en la definición de los umbrales de intervención. Para lograr este objetivo, lo más probable es que se empleen los marcadores del recambio óseo combinándolos con otros factores de riesgo de fractura osteoporótica.

Marcadores óseos y terapéutica.

El papel del recambio óseo previo al tratamiento.

Desde el punto de vista teórico, cabe concebir que las estrategias de intervención pueden ser diferentes en pacientes con recambio óseo acelerado, normal, o incluso anormalmente bajo en el momento del diagnóstico. De ahí que se planteara la cuestión de si las mediciones de los marcadores óseos antes del tratamiento podrían resultar de utilidad en la selección del tratamiento en pacientes individuales.

Riggs y cols. demostraron que dependiendo del recambio óseo inicial, la reducción en los marcadores de recambio óseo resultan igual de eficaces en disminuir las fracturas vertebrales en mujeres con niveles elevados de recambio óseo, con independencia de las variaciones de la DMO.

En conjunto, hay evidencia moderada a favor de que existe una relación entre el recambio óseo inicial y la respuesta al tratamiento antirresortivo. Cuando se tratan con calcitonina, THS o bifosfonatos, los individuos con recambio óseo acelerado previo al tratamiento parecen ganar DMO a una velocidad mayor que aquellos con recambio óseo normal o bajo (Seibel M et al., 2003).

Papel de los marcadores de recambio óseo en el control del tratamiento.

Se piensa que el campo fundamental del empleo clínico de los marcadores bioquímicos de hueso es el control del tratamiento (y de la enfermedad). Estas aplicaciones comprenden la previsión de la respuesta al tratamiento durante el mismo, la vigilancia de la eficacia terapéutica y posiblemente el control del cumplimiento terapéutico por parte del paciente.

Las variaciones de la masa o de la densidad mineral ósea son lentas, y habitualmente no existe efecto terapéutico detectable antes de transcurridos varios años de tratamiento. Los marcadores óseos suelen reaccionar rápidamente a las intervenciones terapéuticas. Se suelen ver variaciones significativas, en 6 a 12 semanas de tratamiento.

El tratamiento con estrógenos (J Fiore CE et al., 2001), (Stroup GB et al., 2001), testosterona (De Rosa M et al., 2001), moduladores selectivos del receptor estrogénico (Johnell O et al., 2002),(Ott SM et al., 2002) o bifosfonatos por vía oral (Murphy MG et al., 2001), (Riis BJ et al., 2001), (Watts NB et al., 2001) (Weber TJ et al., 2001) suele provocar un descenso del 50 al 100% en los marcadores del recambio óseo en un plazo de 3 a 4 meses de tratamiento. Con la mayoría de los tratamientos anticatabólicos, la reducción de los marcadores de la resorción ósea va seguida en general de un descenso de los marcadores de I formación ósea —el resultado del acoplamiento normal entre los procesos de formación y resorción—. Si se mantiene el tratamiento, los marcadores de recambio óseo alcanzan una meseta a en 6 a 12 meses. Una vez interrumpido el tratamiento, la mayor parte de los marcadores de resorción tienden a elevarse hasta los niveles iniciales en pocas semanas o meses.

Varios estudios parecen indicar que los pacientes con la variación más acusada a corto plazo en los marcadores de resorción ósea durante el tratamiento muestran la mayor ganancia de DMO al cabo de 1 ó 2 años de tratamiento. De forma similar, los pacientes en los que no se modifica la DMO (que no responden) a menudo mostraban poca o ninguna variación en los marcadores óseos. Sin embargo, la potencia de esta asociación parece variable y a menudo depende de si se incluyeron en el análisis los pacientes tratados con placebo o no. A diferencia de estudios optimistas

que describen una fuerte correlación entre las variaciones de los marcadores de de recambio óseo y la DMO vertebral, de cadera y de muñeca, otros autores han observado sólo una asociación débil, o incluso ausencia de asociación (Seibel M et al., 2003).

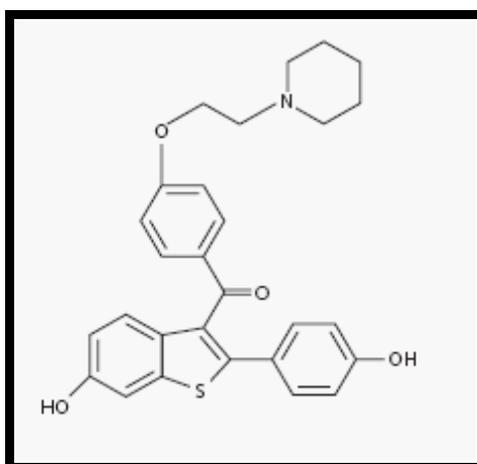
La variación de los marcadores de recambio óseo a los 6 y 12 meses predijo la reducción del riesgo de fractura al cabo de tres años de tratamiento con raloxifeno en mujeres posmenopáusicas (Bjarnason NH et al., 2001). En este estudio, el descenso en la osteocalcina sérica al cabo de un año se relacionaba con el descenso en la incidencia de nuevas fracturas vertebrales a los tres años. Esta relación se mantenía después de ajustar la situación respecto a fracturas vertebrales iniciales y la DMO.

En conjunto, estos datos sugieren que los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo constituyen herramientas útiles para evaluar los efectos terapéuticos después de un corto período de tiempo, y que las mediciones seriadas de los marcadores óseos pueden ayudar a decidir si un paciente responde (o cumple) un determinado tratamiento. En caso de falta de respuesta o incumplimiento terapéutico, las mediciones de marcadores óseos tienen el potencial de ahorrar costes relacionados con la medicación que, en caso contrario, se acumularían a lo largo de un período de varios años. Sin embargo, se debe señalar que en la actualidad ninguno de estos conceptos ha sido demostrado en ensayos clínicos prospectivos controlados, y que no se ha abordado de manera suficiente el empleo clínico de estos marcadores en el seguimiento de pacientes concretos. Por tanto, no existe un consenso científico o clínico respecto al empleo de los marcadores óseos en el seguimiento de pacientes con osteoporosis.

1.7. Raloxifeno.

El raloxifeno es un derivado benzotiofénico no esteroideo que puede clasificarse como modulador selectivo del receptor estrogénico (SERM), ya que su mecanismo de acción corresponde al de un regulador con selectividad hística de los fenómenos mediados por los receptores estrogénicos. Un SERM es un compuesto que se une selectivamente al receptor estrogénico (RE) y ejerce su acción a través de éste, pero que actúa como agonista sobre unos tejidos y como antagonista sobre otros. Esta clasificación de los compuestos de tipo estrogénico se ha establecido para incluir en ella a los agentes diseñados para actuar como agonistas, antagonistas o poseen una actividad agonista clínicamente insignificante de manera tejido específica (Riggs L et al., 2003).

Figura 1.7.1. Estructura química del raloxifeno



Durante muchos años los estrógenos han sido los fármacos más prescritos en el mundo. Sin embargo, después de los resultados del estudio WHI en donde demostraron que el riesgo supera al beneficio esperado, su uso ha quedado únicamente para el tratamiento a corto plazo de los síntomas climatéricos. Aunque otros regímenes de estrógenos o dosificaciones distintas no habían proporcionado resultados similares, los resultados del

ensayo mostraron un aumento en la enfermedad cardiovascular, ACV, embolia pulmonar, y cáncer de mama. Este estudio también evidenció un efecto protector de THS frente al riesgo de fractura y frente a la incidencia de cáncer colorrectal (Rossouw JE et al., 2002).

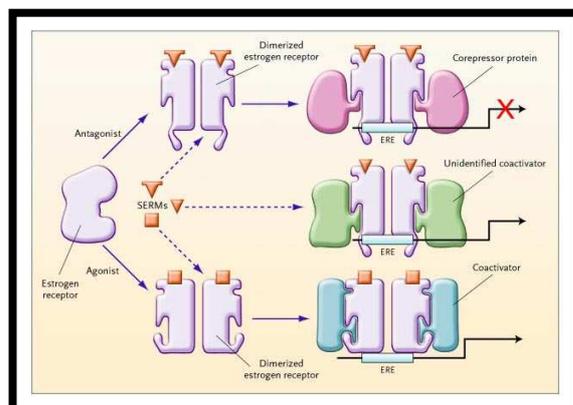
A la luz de los resultados del estudio WHI, aumentó el interés por la terapia con SERMs, debido a su potencial eficacia para mantener la mayoría de los efectos beneficiosos de los estrógenos con un perfil de seguridad mucho más óptimo.

1.7.1. Mecanismo de acción.

Gran parte de la farmacología de los SERMs puede explicarse por tres mecanismos interrelacionados:

- 1.- Diferente expresión de receptor estrogénico en los distintos tejidos.
- 2.- Diferencia estructural del receptor estrogénico en su unión con el ligando.
- 3.- Expresión diferente y unión de distintas proteínas coreguladoras del receptor.

Figura 1.7.1.1. Mecanismo de acción de raloxifeno.



Primero, las células diana para la acción estrogénica contienen concentraciones variables de homodímeros y heterodímeros de una o de las dos especies de receptores estrogénicos—alfa y beta—. Los ratones con alteraciones genéticas del receptor estrogénico alfa y beta presentan fenotipos diferentes, demostrando que cada receptor tiene una acción distinta (Peterson K et al., 2000) (Riggs L et al., 2003). El receptor α actúa casi siempre como activador, mientras que el receptor β puede inhibir la acción activadora del receptor alfa formando heterodímeros con él. Es más, el análisis de los ratones con deleciones de los receptores estrogénicos alfa o beta mostró que el receptor beta inhibe la transcripción de los genes de respuesta estrogénica en torno al 46 %. Así, los niveles relativos de expresión de estas dos isoformas del receptor afectarán a la sensibilidad celular a los estrógenos (Brzowski AM et al., 1997) (Shiau AK et al., 1998) (Riggs L et al., 2003).

Segundo, estudios cristalográficos que evalúan los cambios conformacionales del receptor han evidenciado que estradiol, tamoxifeno, raloxifeno, y/o el antagonista estrogénico puro ICI 164,384, mostraron cambios conformacionales específicos para cada ligando (Paige LA et al.,

1999). Así, la unión del ligando resulta en varias estructuras del receptor estrogénico que actuarán en un continuo de posibilidades que van desde el agonista puro hasta la acción antagónica.

Tercero, se han descubierto más de 20 proteínas correguladoras que se unen al receptor estrogénico modulando su función y actuando sobre la transcripción (Shang Y et al., 2002). Los niveles relativos y absolutos de expresión de las proteínas correguladoras varían en las distintas células diana. Por ejemplo, Shang y Brown encontraron que tamoxifeno y raloxifeno, que son antiestrógenos para el tejido mamario, actúan en las células mamarias reclutando proteínas correpresoras de los promotores del receptor estrogénico. Por el contrario, tamoxifeno, que es un agonista estrogénico para el endometrio, actúa sobre las células endometriales reclutando proteínas coactivadoras de la respuesta estrogénica, a diferencia de raloxifeno, que tiene un efecto neutro en el endometrio. Es más, los efectos agonistas del tamoxifeno eran dependientes de la concentración de un coactivador importante, coactivador-1 del receptor esteroideo (SRC-1), en las células endometriales. Así, las concentraciones locales de diferentes proteínas correguladoras pueden contribuir a la farmacología tejido-selectiva de los SERMs.

Así, en el caso del raloxifeno, el anillo de benzotiofeno (o base) de la molécula se adapta a la cavidad de unión al ligando del RE α y se coordina con los mismos residuos de aminoácido de las proteínas del receptor que los estrógenos. Esta íntima unión, que conlleva la activación del RE, es la responsable de la actividad agonista estrogénica del compuesto. El dominio FA-2 es un área de la estructura del receptor, necesaria para activar las secuencias de genes con capacidad para regular la actividad estrogénica en los tejidos reproductivos, como el útero y la mama. La conformación

inducida por el raloxifeno, distinta de la que produce la unión del RE α con estradiol en este dominio no favorece la estimulación en estos tejidos.

La cadena lateral básica, grande y rígida, del raloxifeno y sobresale de ella alterando la orientación de un área específica del receptor (hélice 12). Esta cadena es la clave de las propiedades antagonistas del fármaco sobre el tejido uterino, en contraste con las propiedades agonistas parciales del tamoxifeno.

1.7.2. Raloxifeno y osteoporosis.

Estudios preclínicos y clínicos han evaluado los efectos estrogénicos agonistas de distintos SERMs sobre el metabolismo óseo. No obstante, las evidencias disponibles sugieren que existen diferencias significativas en la capacidad antiresortiva de los diferentes compuestos. Estudios previos con tamoxifeno han mostrado que este fármaco ejerce efectos favorables sobre el esqueleto de la mujer postmenopáusica con un incremento de la masa ósea, aunque no muestra un descenso significativo en la incidencia de fracturas. Más consistentes son los resultados obtenidos a partir de los ensayos clínicos efectuados con raloxifeno.

El raloxifeno es un fármaco aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis postmenopausica. Diversos estudios clínicos han evidenciado que la administración de este fármaco produce un aumento en la masa ósea en términos de DMO entre 1-3% dependiendo de la localización y de la duración del tratamiento. En relación con los marcadores de remodelado óseo este fármaco produce una reducción discreta de los mismos entre 20-30% dependiendo del tipo de marcador y momento de la determinación (Siris ES et al., 2005). En términos de

reducción de riesgo de fractura, la administración de raloxifeno produce una reducción del riesgo de fractura vertebral tanto en pacientes con y sin fractura vertebral previa (Sarkar S et al., 2002). En el estudio MORE, en el subgrupo de pacientes con osteoporosis establecida, el número necesario de pacientes a tratar (NNT) para evitar una nueva fractura vertebral fue de 16 y 10 para las dos dosis de 60 y 120 mg. Además, en ambos grupos de pacientes se observó una reducción significativa en la aparición de fracturas vertebrales múltiples entre el 50 y el 80%. Este estudio no mostró una reducción de fracturas no vertebrales, exceptuando la fractura de tobillo. Una posible explicación a este hallazgo es la relativa baja incidencia de ciertas fracturas no vertebrales durante el período de estudio, además del propio diseño metodológico. No obstante, un estudio post hoc de la cohorte del estudio MORE muestra que en pacientes con fracturas vertebrales graves basales, raloxifeno disminuye el riesgo de nuevas fracturas vertebrales (RR: 0,74; IC: 0,54-0,99) y no vertebrales (RR: 0,53; IC: 0,29-0,99).

En el reciente estudio RUTH (Barrett-Connor et al., 2006), raloxifeno redujo el riesgo de las fracturas vertebrales clínicas (64 frente 97 eventos; RR: 0,65; intervalo de confianza del 95%, 0,47 a 0,89; reducción absoluta del riesgo, 1,3 por 1000).

1.7.3. Raloxifeno y riesgo cardiovascular.

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con raloxifeno origina cambios favorables en el perfil lipídico, sin embargo existen ciertas diferencias a los cambios observados con el tratamiento estrogénico. Ambas terapias reducen los niveles de LDL-colesterol en 10-15%, sin

existir cambios apreciables en los valores de HDL-colesterol total. No obstante, raloxifeno aumenta los valores de la subfracción HDL2, que es la fracción considerada cardioprotectora (Wenger et al., 1999). Además, raloxifeno no aumenta los niveles de triglicéridos, a diferencia de los estrógenos y tamoxifeno que sí los aumentan. Por último, raloxifeno no incrementa los niveles de proteína C reactiva (PCR) y disminuye los niveles de homocisteína sérica, en contraposición con la terapia estrogénica (Walsh B et al., 2000). Los resultados de los estudios HERs y WHI demostraron que el riesgo cardiovascular no disminuía tras el tratamiento con estrógenos o estrógenos más progestágenos. Además, un análisis secundario de los datos procedentes del estudio MORE no mostró un efecto general de raloxifeno en los eventos cardiovasculares, pero sugería una reducción del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares en las mujeres que tenían un riesgo aumentado.

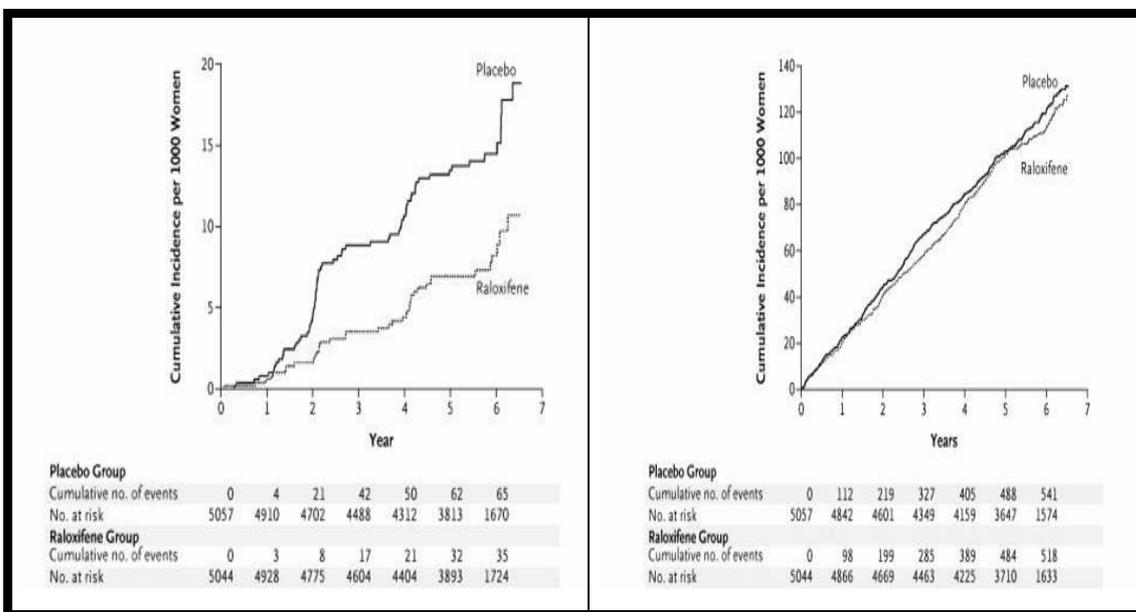
Tabla 1.7.3.1. Efecto de distintos SERMs sobre parámetros de perfil lipídico, inflamatorios y de la coagulación.

Variable	Hormone-Replacement Therapy and SERMs			
	Hormone-Replacement Therapy	Tamoxifene	Toremifene	Raloxifene
<i>percent difference from change with placebo</i>				
Low-density lipoprotein cholesterol	-12†	-19†	-21†	-12†
High-density lipoprotein cholesterol	7†	-2	14†	0
Triglycerides	18†	31†	-4	-4
Apolipoprotein A-I	13†	5	13†	3
Apolipoprotein B	-4	-9†	-10†	-9†
Lp(a) lipoprotein	-19†	-14†	-53†	-7†
Fibrinogen	-1	—	—	-10†
Plasminogen activator inhibitor type 1	-19†	—	—	8
Homocysteine	-7†	—	—	-8†
C-reactive protein	84†	—	—	-7
Tumor necrosis factor α	-11†	—	—	-5†
Interleukin-6	11	—	—	1

El efecto favorable de raloxifeno en los marcadores de riesgo cardiovascular, junto con la evidencia de estudios observacionales de que el tratamiento con estrógenos estaba asociado con una disminución del riesgo

de enfermedad coronaria (CHD) en mujeres postmenopáusicas, condujo al diseño de un importante ensayo clínico aleatorizado con raloxifeno denominado RUTH (Raloxife use for the heart), publicado recientemente (Barrett-Connor et al., 2006). Se asignaron aleatoriamente 10.101 mujeres postmenopáusicas (edad media, 67.5 años) con CHD o múltiples factores de riesgo múltiples de CHD a 60 mg diario de raloxifeno o placebo y se siguieron durante una media de 5,6 años. Los dos endpoints primarios eran los eventos coronarios (es decir, muerte por causas coronarias, infarto de miocardio u hospitalización por un síndrome coronario agudo) y cáncer de mama invasivo. Cuando se comparó con el placebo, raloxifeno no tuvo ningún beneficio significativo en el riesgo de eventos coronarios primarios (533 frente 553 eventos; relación de riesgo, 0,95; el intervalo de confianza del 95%, 0,84 a 1,07. No hubo diferencia significativa en los índices de muerte por cualquier causa o ACV, pero el tratamiento con raloxifeno se asoció con un riesgo incrementado de ACV fatal (59 frente 39 eventos; RR, 1,49; intervalo de confianza del 95%, 1,00 a 2,24; aumento absoluto del riesgo, 0,7 por 1000 mujer-años) y trombosis venosa profunda (103 frente 71 eventos; RR: 1,44; intervalo de confianza del 95%, 1,06 a 1,95; aumento absoluto del riesgo, 1.2 por 1000 mujer-años). El impacto de estos resultados ha puesto en evidencia los posibles beneficios de este tratamiento como prevención del riesgo cardiovascular (Barrett-Connor et al., 2006).

Figura 1.7.3.1. RUTH study. Figura A muestra reducción en incidencia de cancer de mama en el grupo de raloxifeno. Figura B muestra la incidencia de eventos cardiovascularres entre los grupos placebo y raloxifeno.



1.7.4. Raloxifeno y cáncer de mama

Raloxifeno en estudios clínicos ha demostrado una reducción en la incidencia de cáncer de mama. Estos resultados se evidenciaron en principio en estudios diseñados para evaluar este fármaco como tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica.

En los 4 años del estudio MORE, el raloxifeno redujo la incidencia de cáncer de mama en un 72%. En el estudio CORE, 5.213 mujeres del MORE que no tenían cáncer de mama continuaron por otros 4 años más con el régimen de raloxifeno (60 mg/día) o placebo, como se había asignado aleatoriamente en el MORE. El objetivo final fue la incidencia de

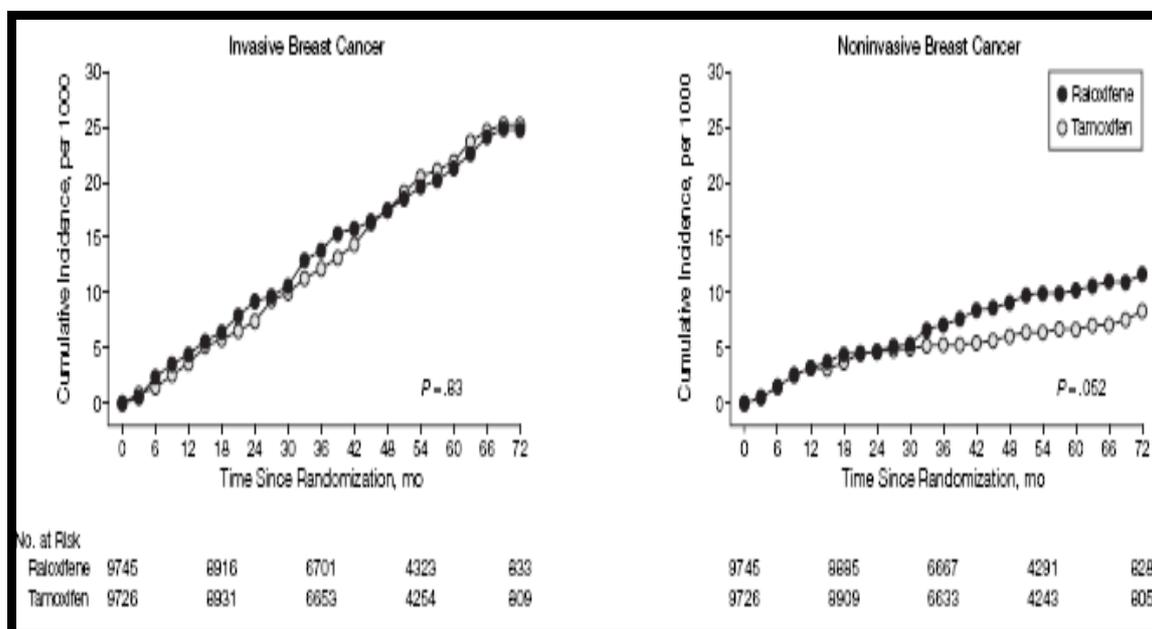
cáncer de mama. Al final del estudio, el grupo de raloxifeno mostró una reducción significativa de la incidencia de cáncer de mama (RR 0,41; IC 95%, 0,24-0,71) y en el cáncer de mama con receptor estrogénico positivo (RE+) (RR 0,35; IC 95%, 0,18-0,66) cuando se comparaban con el grupo placebo. Durante los 8 años, combinando los dos estudios, la incidencia total de cáncer de mama y en cáncer de mama RE+ fueron significativamente menores en un 66% (RR 0,34; IC 95%, 0,18-0,66) y 76% (RR 0,24; IC 95%, 0,15-0,40), respectivamente, comparado con el placebo.

En el estudio RUTH (Barrett-Connor et al., 2006), se redujo el riesgo del cáncer de mama invasivo (40 frente 70 eventos; relación de riesgo, 0,56; intervalo de confianza del 95%, 0,38 a 0,83; reducción absoluta del riesgo, 1,2 cánceres de mama invasivos por 1000 mujeres tratadas por año); el beneficio fue sobre todo debido a una reducción del riesgo de cánceres de mama invasivos estrógeno-receptor-positivos.

El estudio STAR (Study of Tamoxifen and Raloxifene), uno de los estudios más amplios realizados en la prevención de cáncer de mama, ha mostrado que el raloxifeno consigue una reducción del riesgo de cáncer de mama, en mujeres posmenopáusicas de alto riesgo, similar al tamoxifeno a los cinco años. El estudio STAR incluyó casi 20.000 mujeres posmenopáusicas con un riesgo de enfermedad aumentado (por edad, historia familiar, historia personal, edad hasta el primer periodo menstrual y primer parto) que recibieron de forma aleatoria raloxifeno o tamoxifeno durante 5 años, con el objetivo de comparar ambos SERMs en la prevención del cáncer de mama. Los datos que se derivan del estudio muestran que las reducciones en la incidencia de cáncer de mama invasivo no presentaron diferencias

significativas entre ambos grupos, cifrándose las reducciones del riesgo en torno a un 50 %. En pacientes posmenopáusicas con un riesgo aumentado de cáncer de mama, raloxifeno es igual de eficaz que tamoxifeno, evitando además algunos de los efectos adversos graves que se conoce están asociados a tamoxifeno. En concreto, los datos del estudio STAR han mostrado que la administración de raloxifeno disminuye en un 29% la incidencia de trombosis venosa profunda y embolias pulmonares, respecto a tamoxifeno. Además, también pudo comprobarse que tras cuatro años de seguimiento, la administración de raloxifeno disminuyó en un 36% la incidencia de cáncer de útero, respecto a tamoxifeno. Este tipo de cáncer, especialmente el de endometrio, es uno de los efectos secundarios más graves de tamoxifeno, aunque no muy frecuente (Vogel et al., 2006).

Figura 1.7.4.1. Estudio STAR: Incidencia de cancer de mama invasivo y no invasivo entre los grupos de raloxifeno y tamoxifeno.



1.7.5. Perfil de seguridad del raloxifeno.

La información disponible procede de los ensayos clínicos realizados en prevención y tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Los efectos secundarios más frecuentes han sido los sofocos, calambres en piernas y la aparición de un leve edema periférico. Así, en el estudio MORE la incidencia de sofocos fue del 9,7% en grupo tratado con raloxifeno frente al 6,4% en el grupo placebo. No obstante, la incidencia de sofocos severos con interrupción del tratamiento fue baja (<3%) y sin diferencias significativas con el grupo placebo. El efecto adverso grave que con más frecuencia ha sido descrito en las pacientes en tratamiento con SERMs es un incremento en el riesgo de episodios de trombosis venosa profunda con un riesgo relativo próximo a 3. Este incremento del riesgo es comparable a los resultados publicados con THS en población postmenopáusica (RR: 2-4). En términos absolutos el riesgo de tromboembolia venosa en mujeres tratadas con raloxifeno se sitúa entre el 0,7 y el 1%, lo que supone un caso en 155 mujeres tratadas durante 3 años. El aumento de riesgo de tromboembolismo fue más del doble para el grupo de raloxifeno versus el grupo placebo durante el CORE (RR 2,17; IC 95%, 0,83-5,70).

Tabla 1.7.5.1. Comparación de los efectos secundarios de los distintos SERMS.

Table 1. Comparison of Selected Actions and Side Effects of Estrogen and Clinically Available SERMs.*				
Side Effect	Estrogen	Tamoxifen	Toremifene	Raloxifene
Hot flashes	↓↓↓	↑‡	↑‡	↑‡
Uterine bleeding	↑↑↑	↑	↑	↔
Risk of endometrial cancer	↑↑‡	↑	?	↔
Prevention of postmenopausal bone loss	↑↑↑	↑	↔	↑↑
Risk of breast cancer	↑↑	↓↓	↓↓§	↓↓
Favorable pattern of serum lipids	↑↑↑¶	↑	↑↑	↑
Venous thrombosis	↑↑	↑↑	?	↑↑

1.7.6. Raloxifeno y sistema OPG-RANKL.

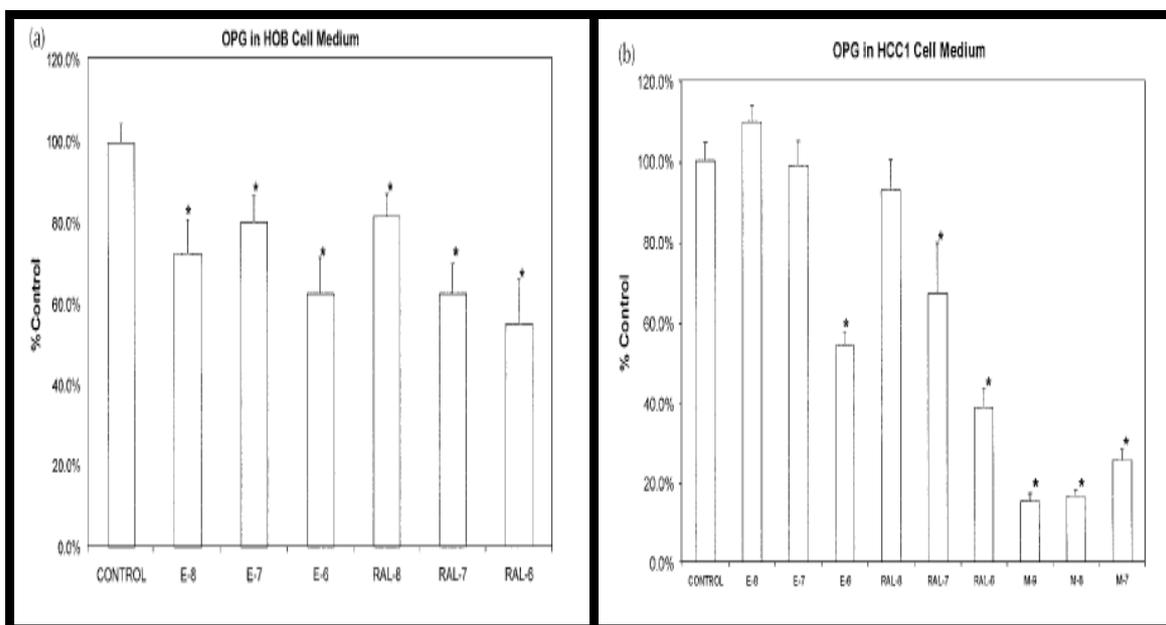
En los últimos años el sistema OPG-RANKL ha generado una gran expectación dentro de la fisiología, fisiopatología y terapéutica de la patología ósea.

Solamente dos estudios in vitro han documentado la regulación de raloxifeno sobre el sistema de OPG - RANKL y ambos sugieren que la acción de raloxifeno sobre este sistema es al menos en parte distinta de los estrógenos.

Cheung y cols. en 2003 compararon los efectos de raloxifeno y 17 beta estradiol en la regulación de IL-6, IL-1, RANKL y OPG en cultivo de osteoblastos. La administración de raloxifeno y 17βestradiol produjo una reducción significativa de los niveles de OPG siendo más evidente con la administración de raloxifeno con una reducción dosis dependiente. En

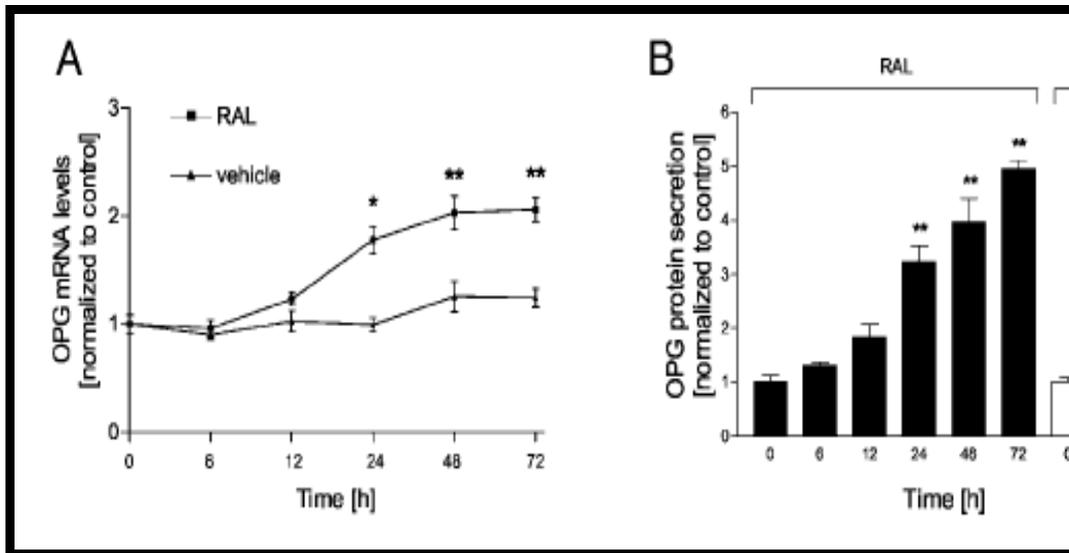
relación con el RANKL raloxifeno redujo los niveles de esta citoquina, a diferencia de 17β estradiol que no produjo cambios. Además la administración de raloxifeno produjo un descenso en el ratio RANKL/OPG (Cheung et al., 2003).

Figura 1.7.6.1. Efecto de raloxifeno o 17β estradiol sobre los niveles de OPG em dos tipos de cultivos (Cheung et al., 2003).



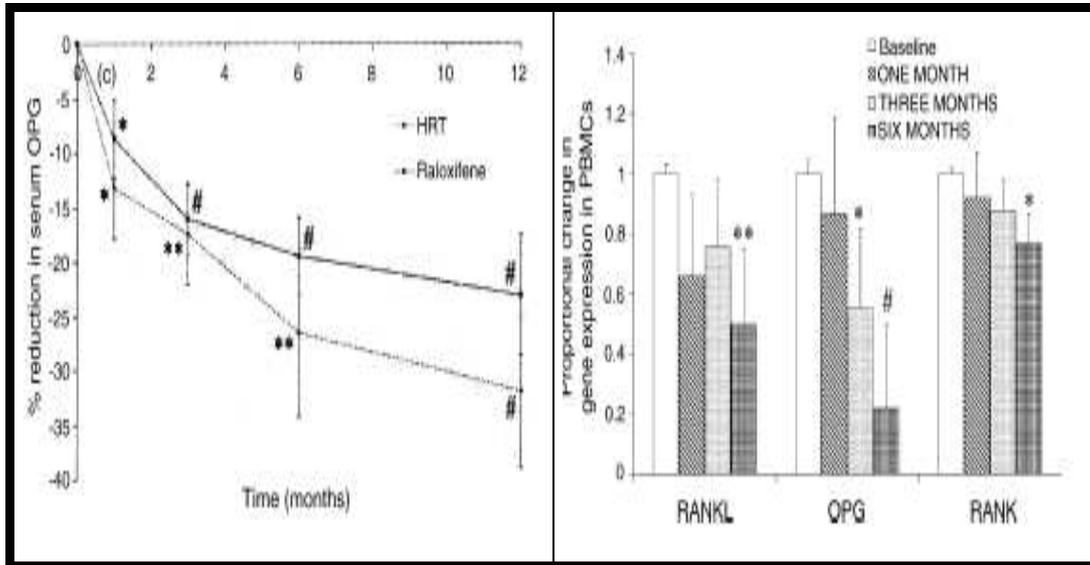
En el otro estudio *in vitro* sin embargo los resultados son diametralmente opuestos (Viereck et al., 2003). La administración de raloxifeno produjo de manera dosis y tiempo dependiente un aumento de la expresión de ARN m de OPG. Además produjo una reducción en la expresión de IL-6.

Figura 1.7.6.2. Efecto de raloxifeno sobre los niveles de OPG en dos tipos de cultivos (Viereck et al., 2003).



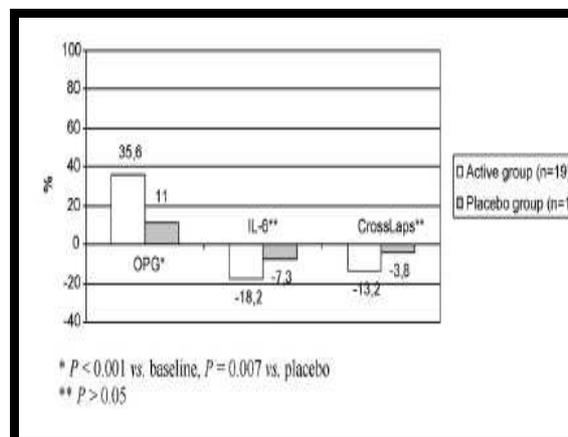
Bashir y cols. publicaron el primer estudio clínico que valora la relación de la administración de raloxifeno o estrógenos durante 12 meses sobre los niveles séricos de OPG y la expresión génica de OPG y RANKL en células mononucleares periféricas. Tras un año de tratamiento con raloxifeno se produjo un descenso en los niveles séricos de OPG así como de la expresión génica de OPG y RANKL. Los cambios en la expresión de OPG se correlacionó de manera significativa con los cambios en DMO y los cambios en CTX (Bashir et al., 2005).

Figura 1.7.6.3. Efecto de raloxifeno sobre los niveles de OPG (Bashir et al., 2006).



Por último, un estudio prospectivo, randomizado y controlado por placebo en mujeres postmenopáusicas (n: 20) evaluó los cambios en marcadores de remodelado (CTX sérico) OPG e IL-6 tras la administración de raloxifeno. Concluyeron que la administración de raloxifeno aumenta los niveles séricos de OPG (Messalli et al., 2007).

Figura 1.7.6.4. Efecto de raloxifeno sobre los niveles de OPG (Messalli et al., 2007).



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. Variables antropométricas y clínicas básicas de la población de estudio:

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
Edad (años)	47	51	78	64	6,5
Peso (kg)	47	35,00	85,00	67,49	11,12
Talla (m)	47	1,42	1,64	1,52	,059
IMC (kg/m2)	47	17,5	39,6	28,3	4,3
Edad de menarquia	47	9,00	16,00	12,91	1,85
Edad de menopausia	47	35	58	48,02	4,25
Años de menopausia	47	2	36	14,83	8,38

Tabla 4.1.2. Variables densitométricas al comienzo del estudio:

	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
DMO CL (g/cm2)	47	0,49	0,81	0,72	0,07
T-Score CL	47	-2.5	-3.2	-2,73	0,6
Z score CL	47	-3,7	0,3	-1,49	0,81
DMO CF(g/cm2)	47	0,37	0,87	0,64	0,09
T-Score CF	47	- 0.2	-1.9	-1.9	0,86
Z score CF	47	-2,6	1,7	-0,13	0,9
DMO CT(g/cm2)	47	0,38	0,93	0,74	0,11
T-Score CT	47	-0.1	-1.6	-1.6	0,9

DMO: densidad mineral ósea. CL: columna lumbar; CF: cuello femoral. TC: total de cadera.

Tabla 4.1.3. Epidemiología descriptiva de las variables cualitativas clínicas:

		N	%
Hábito tabáquico	No fumador	42	90
	<20 c/día	5	10
	>20 c/día	0	0
Hábito alcohólico	No consumo	47	100
	<40 gr/día	0	0
	>40 gr/día	0	0
Consumo de café	No consumo	5	10
	<2 tazas/día	42	90
	>2 tazas/día	0	0
Actividad física	Sedentaria	14	30
	Actividad moderada	33	70
	Actividad intensa	0	0
Ingesta cálcica	0-500 mg/día	14	28
	500-1000 mg/día	28	62
	1000-1500 mg/día	5	10

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

	N	%
Fractura vertebral	10	21,3
Fractura vertebral múltiple	5	10,06
Fractura Colles	10	21,3
Fractura cadera	1	2,1
Otras fracturas *	9	19,1
Cualquier fractura	21	44,7

*Tibia, costillas, húmero.

Durante el estudio se produjeron una fractura vertebral nueva y en 2 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:

	N	%
20-25 (kg/m² (Normopeso)	6	12,8
25-30(kg/m² (Sobrepeso)	18	38,3
>30 (kg/m² (Obesidad)	23	48,9

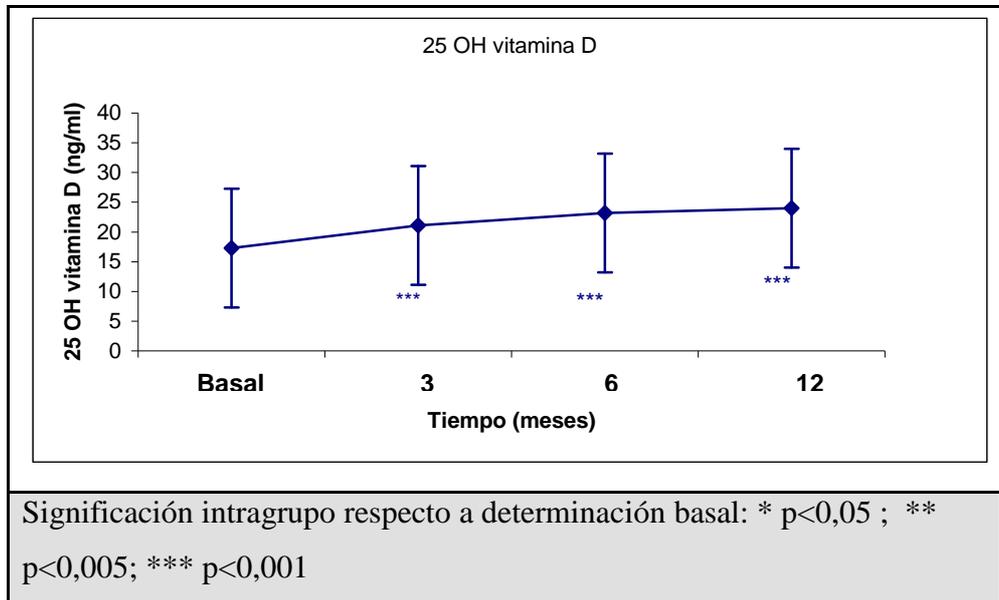
4.2. Evolución de niveles de calcio, fósforo, PTH y 25 OH vitamina D.

Tabla 4.2.1. Evolución de hormonas calciotropas, calcio y fósforo tras la administración de raloxifeno:

	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
Calcio (mg/dl)	9,43 ± 0,39	9,40 ± 0,36	9,36 ± 0,28	9,38 ± 0,31
Fósforo (mg/dl)	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,4
PTH i	37,59±19,6	43,21±19,91	45,89±21,15	47,01±21,01
25 OH vitamina D	17,3 ± 9	21,10 ± 7,9*	23,2 ± 10*	24,01± 14*
Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal: * p<0,05 ; ** p<0,01; *** p<0,001.				

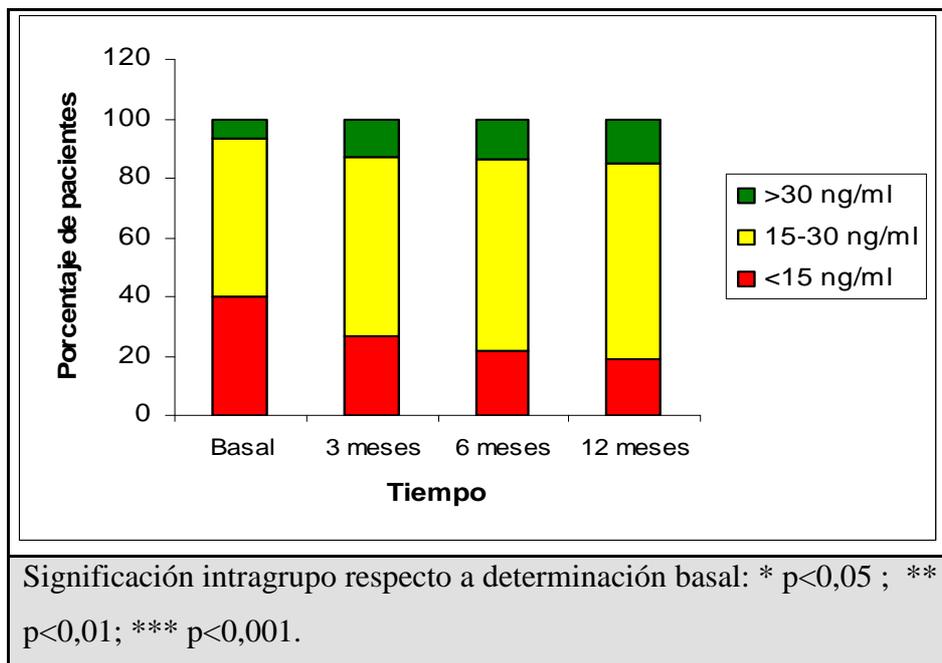
No se observaron cambios significativos en los niveles de calcio y fósforo séricos a los 3, 6 y 12 meses de seguimiento. El tratamiento con suplementos de vitamina D produjo un aumento progresivo de los niveles de 25 OH vitamina D estadísticamente significativo ($p<0.05$). Este aumento fue del 22% a los 3 meses, 24% a los 6 meses y 26% a los 12 meses. Los cambios en los valores de PTH i mostraron un ascenso discreto que no alcanzó la significación estadística.

Figura 4.2.1. Evolución de los niveles de 25 OH vitamina D.



Siguiendo los criterios de *Holick y colaboradores, 2005*, al inicio del estudio el 93,2% 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 el 19% de las pacientes mantenía niveles de 25 OH vitamina D inferiores a 15 ng/ml, el 66 % presentaba niveles inadecuados entre 15 y 30 ng/ml y un 19% de las pacientes se encontraba en rango de suficiencia de vitamina D con niveles superiores a 30 ng/ml (Figura).

Figura 4.2.2. Evolución de los niveles de 25 OH vitamina D.



4.3. Cambios en densidad mineral ósea.

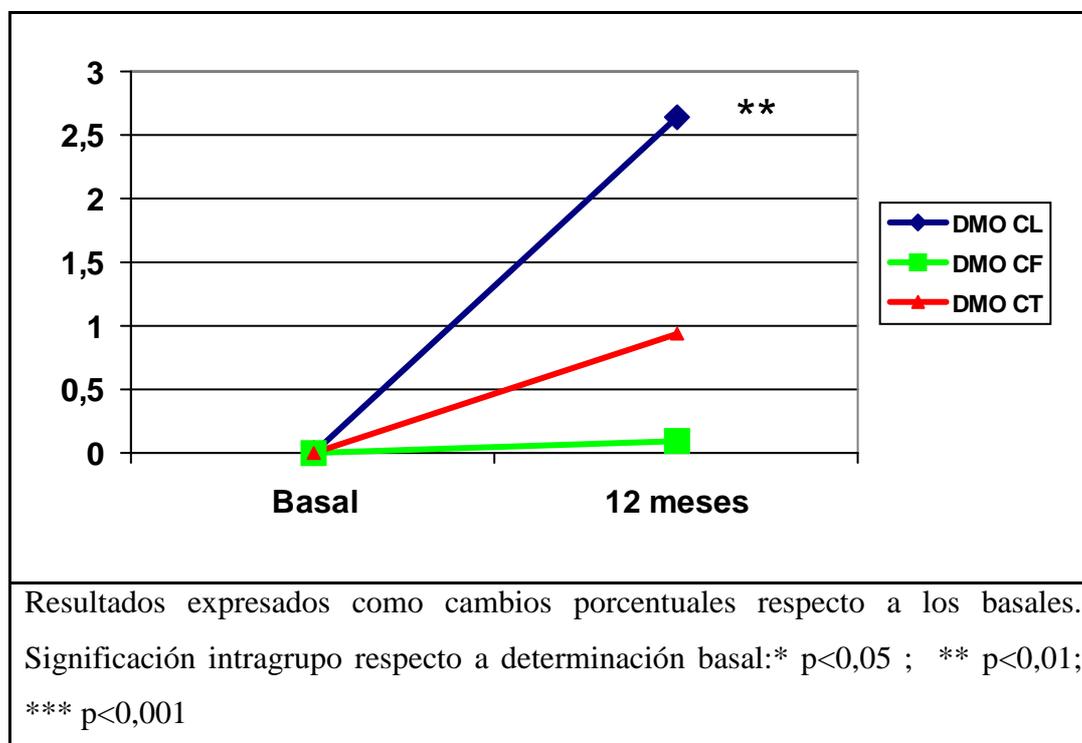
El tratamiento con raloxifeno produjo un aumento de la DMO a nivel de las tres localizaciones analizadas, aunque sólo los cambios en columna lumbar alcanzaron significación estadística (Tabla 4.3.1, Figura 4.3.1).

Tabla 4.3.1. Evolución de la DMO tras la administración de raloxifeno:

	Basal	12 meses	%cambio	p
DMO CL(mgr/cm2)	725,2± 69	743,3 ± 82*	2,64±7,73	0,004
DMO CF(mgr/cm2)	638,7 ± 93	638,2 ±94	0,10±6,48	0,2
DMO CT(mgr/cm2)	739± 111	743,6± 109	0,93±6,06	0,3

Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal:* p<0,05 ; ** p<0,01; *** p<0,001

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



Tras un año de tratamiento con raloxifeno se produjo un aumento significativo de la DMO CL (p: 0,004). No se produjeron cambios significativos en DMO CF y DMO CT.

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.

El porcentaje de pacientes respondedoras al tratamiento definido como un aumento de masa ósea superior a 1% en las distintas. El porcentaje de pacientes respondedoras fue del 75 %.

4.4. Cambios en marcadores de remodelado:

El tratamiento con raloxifeno 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).

Tabla 4.4.1. Evolución de los marcadores de remodelado óseo tras la administración de raloxifeno.

	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
b ALP (µg/ml)	90,3 ± 47,6	66,6 ± 16,7**	64,4 ± 18,2**	64,6 ± 19,6**
t ALP (UI/l)	15,6 ± 6,9	11,7 ± 5,3**	10,1 ± 6,3**	9,8 ± 6,8**
OC (ng/ml)	3,9 ± 2,3	3,1 ± 2**	2,4 ± 2**	1,5 ± 1,2**
TRAP (UI/l)	3,1 ± 0,5	2,6 ± 0,6**	2,7 ± 0,5**	2,6 ± 0,5**
CTX (µg/mmol)	612 ± 321	416 ± 275**	422 ± 252**	467 ± 259**
Indice Ca/cr Orina	0,17 ± 0,09	0,20 ± 0,13	0,20 ± 0,12	0,19 ± 0,09

Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

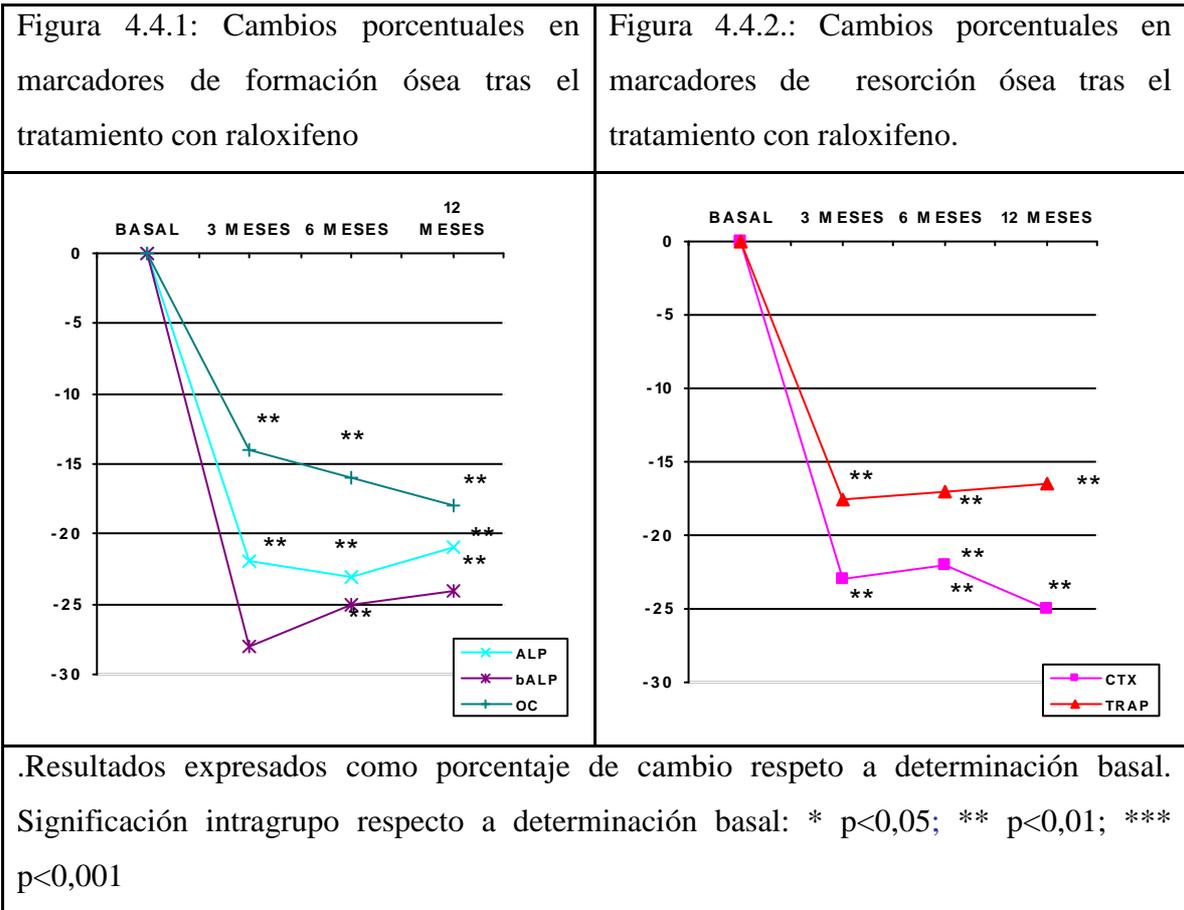
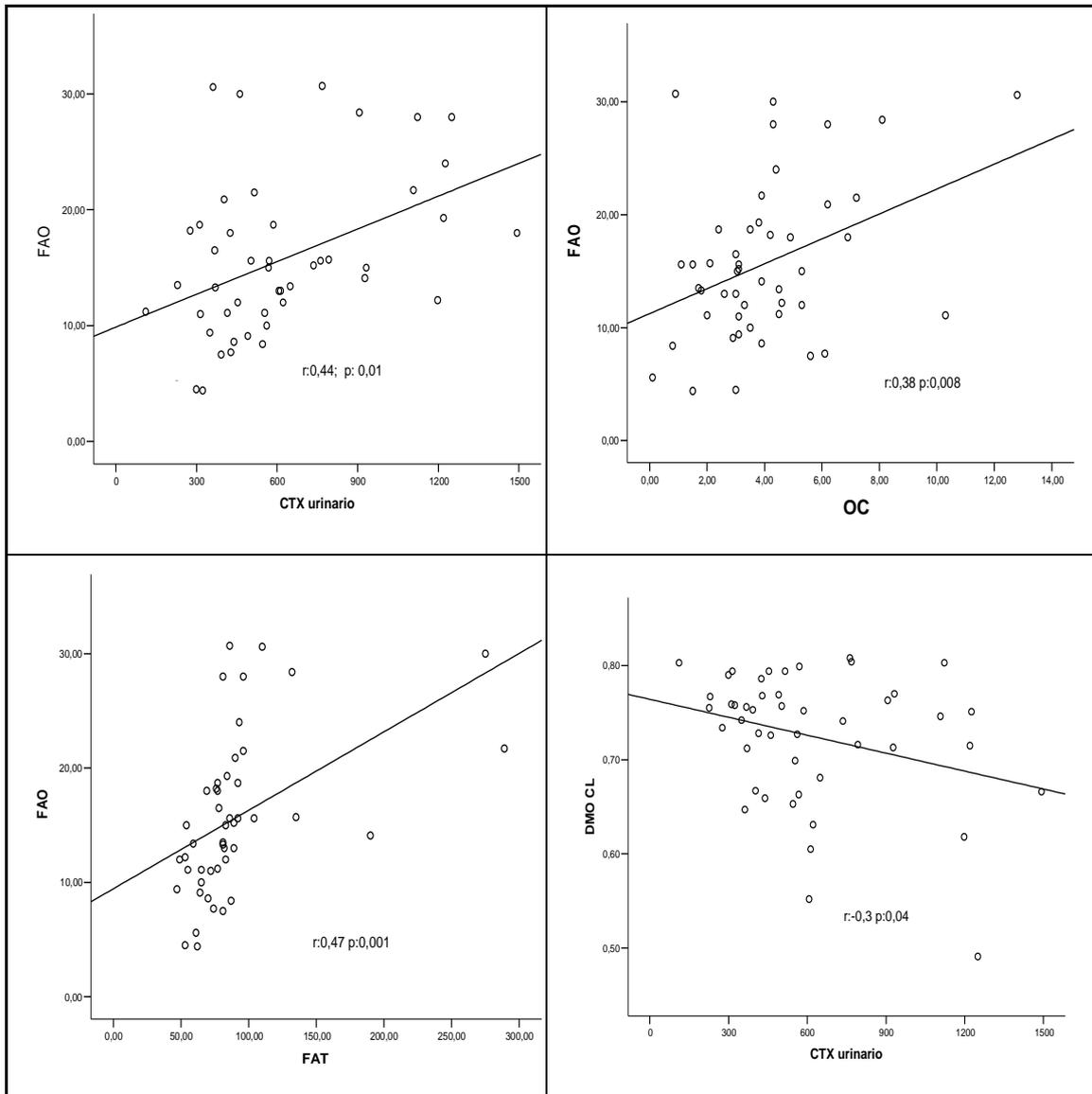


Tabla 4.4.2. Correlación entre niveles basales de marcadores de remodelado y la DMO:

	TRAP	OC	b ALP	t ALP	CTX	DMO CL	DMO CF
OC	0,23						
b ALP	0,22	0,38**					
t ALP	0,10	0,06	0,47**				
CTX	0,12	0,14	0,44**	0,24			
DMO CL	0,05	-0,09	-0,06	0,01	-0,29**		
DMO CF	-0,11	-0,21	0,03	0,03	0,04	0,29	
DMO CT	-0,03	-0,25	0,014	0,16	-0,06	0,27	0,79

Correlación Pearson: Significación intergrupo: * p<0,05; ** p<0,01; *** p <0,001.

Figura 4.4.3. Correlación lineal simple entre los distintos marcadores de remodelado y entre estos marcadores y la DMO con significación estadística.



Encontramos una correlación negativa entre los niveles de CTX urinario y la DMO en columna lumbar.

Tabla 4.4.3. Comparación de niveles basales de marcadores en función de a presencia de fractura osteoporótica:

	Fracturadas	Sin fractura	p
FA total(u/l)	103,14 ± 68,93	79,92 ± 14,43	0,14
FA ósea(ug/ml)	16,82 ± 7,43	14,68 ± 6,44	0,30
OC(ng/ml)	4,68 ± 2,96	3,42 ± 6,94	0,07
CTX	647,49 ± 293	583,72 ± 345	0,51
TRAP	3,06 ± 0,40	3,04 ± 0,58	0,89

No encontramos diferencias significativas en los niveles de remodelado entre las pacientes fracturadas y no fracturadas.

Tabla 4.4.4. Relación entre los cambios en la densidad mineral ósea (DMO) y los cambios en marcadores de remodelado a los 3, 6, 12 meses tras un año de tratamiento con raloxifeno:

Cambios en marcadores						
	3 meses	6 meses	12 meses	3 meses	6 meses	12 meses
DMO CL	-0,23	-0,19	-0,19	0,03	-0,08	0,39**
DMO CF	-0,01	0,01	-0,03	-0,04	0,04	0,25
DMO CT	-0,10	-0,02	-0,26	-0,14	-0,09	0,01
	-0,10	-0,02	-0,26	-0,14	-0,09	0,01
Cambios en marcadores						
Cambios DMO	OC	OC	OC	TRAP	TRAP	TRAP
	3 meses	6 meses	12 meses	3 meses	6 meses	12 meses
DMO CL	0,09	0,08	0,12	0,16	0,06	-0,21
DMO CF	0,08	0,08	0,20	0,09	-0,19	-0,05
DMO CT	0,06	0,06	-0,04	0,27	0,03	-0,18
Cambios en marcadores						
Cambios DMO	CTX	CTX	CTX			
	3 meses	6 meses	12 meses			
DMO CL	0,26	0,14	0,11			
DMO CF	0,10	0,011	0,26			
DMO CT	0,16	0,06	-0,02			

4.5. Cambios en sistema OPG/RANKL

Los niveles basales de OPG, RANKL libre 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 significativo a los 3 y 6 meses de tratamiento con raloxifeno ($p < 0.05$), volviendo a los valores iniciales a los

12 meses de tratamiento. Los niveles séricos de RANKL libre disminuyeron de forma significativa respecto a la situación basal al año de iniciar el tratamiento ($p < 0.001$) (Figura 4.5.1).

Al inicio del estudio encontramos un alto porcentaje de valores indetectables de RANKL libre sérico (68%) que aumentó a lo largo del tratamiento con raloxifeno, alcanzando al año la significación estadística.

Tabla 4.5.1. Evolución de los marcadores de osteoclastogénesis tras la administración de raloxifeno.

	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
OPG (pg/mL)	84,7 ± 34,3	74,6 ± 34,4**	81,4 ± 34,3**	84,9 ± 32,4
RANKL pg/mL)	5,8 ± 13,45	4,6 ± 10,5	3,9 ± 6,8	1,85 ± 0,79*
OPG/RANKL	45,03 ± 25,86	39,31 ± 23,83	42,15 ± 25,62	49,99 ± 22,23

Resultados expresados como media ± desviación típica. Significación intragrupo respecto a determinación basal: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

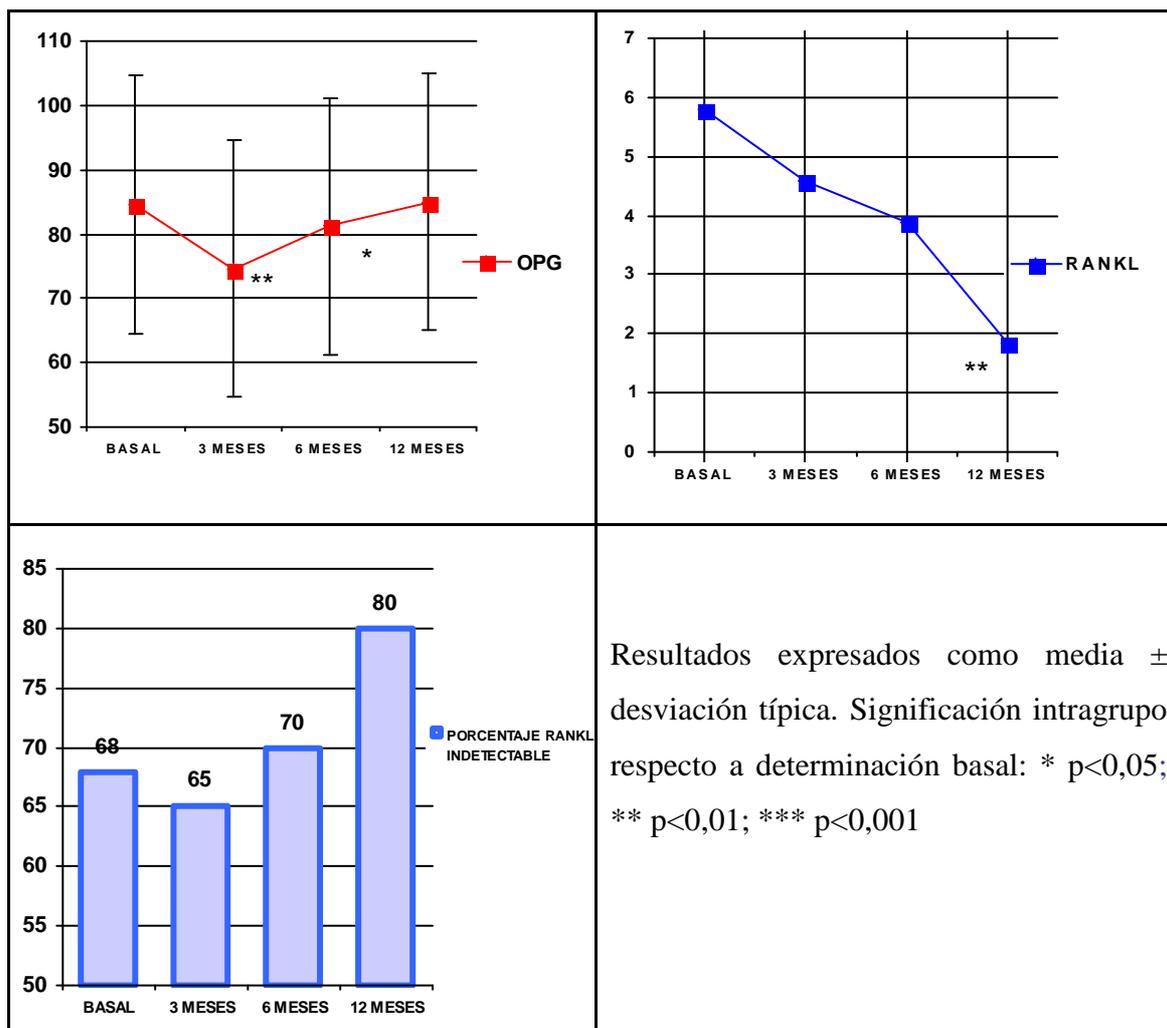
No encontramos diferencias significativas entre los marcadores de osteoclastogénesis en relación a la presencia o no de fracturas por fragilidad.

Tabla 4.5.2. Niveles sericos de los marcadores de osteoclastogénesis en relación a la presencia de fracturas por fragilidad:

	Fracturadas	Sin fractura	p
OPG (pg/ml)	82,36 ± 40,77	86,58 ± 28,88	0,68
RANKL libre (pmol/l)	4,62 ± 9,87	6,84 ± 15,89	0,58

Ratio OPG/RANKL	47,87 ± 29,49	42,73 ± 22,86	0,51
------------------------	---------------	---------------	------

Figura 4.5.1. Cambios en los niveles séricos de OPG, RANKL y cambios porcentuales a lo largo del tratamiento.



4.6. Relación entre cambios en masa ósea, OPG, RANKL libre y marcadores de remodelado.

4.6.1. Correlación entre los niveles basales de OPG, RANKL, masa ósea y marcadores de remodelado.

Tabla 4.6.1.1. Correlación lineal simple (Pearson) entre los niveles séricos basales de OPG y RANKL y los marcadores de remodelado.

	CTX	b ALP	t ALP	OC	TRAP
OPG	-0,06	0,23	-0,14	0,29	0,15
RANKL	-0,13	-0,20	-0,14	-0,06	0,11

No se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de marcadores de remodelado y los marcadores de osteoclastogénesis.

Tabla 4.6.1.2. Correlación entre los niveles séricos de OPG y RANKL y la DMO

	DMO CL	DMO CF	DMO CT
OPG	-0,27	-0,32*	-0,28
RANKL	0,07	0,19	0,17
Correlación lineal simple (Pearson). Significación intergrupos: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001			

Figura 4.6.1.1. Correlación lineal simple entre niveles basales de OPG, edad y años de menopausia.

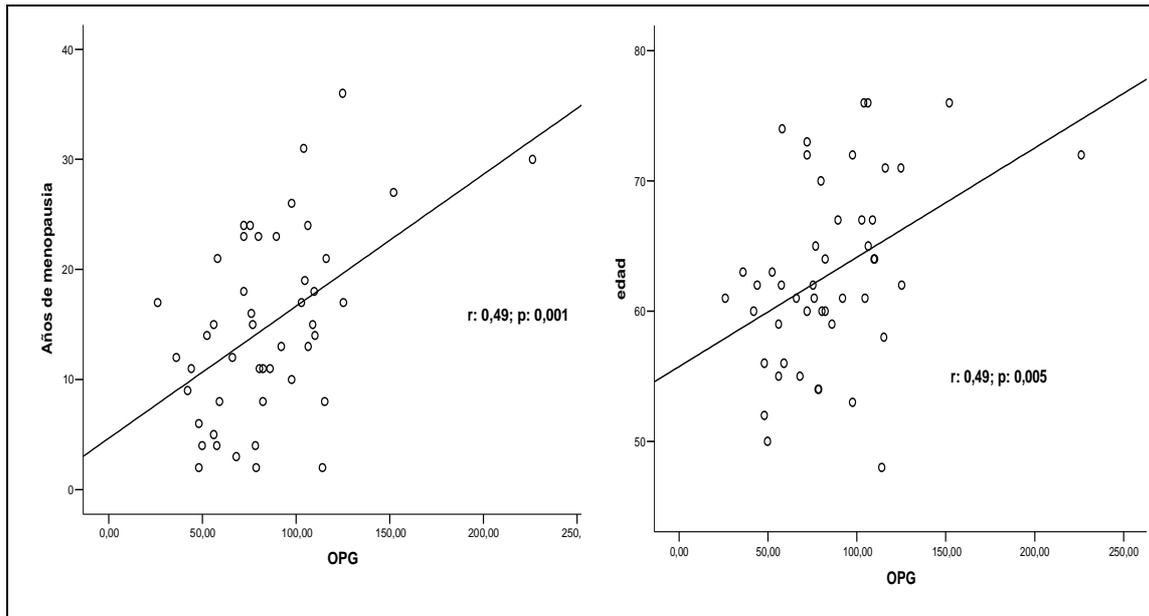
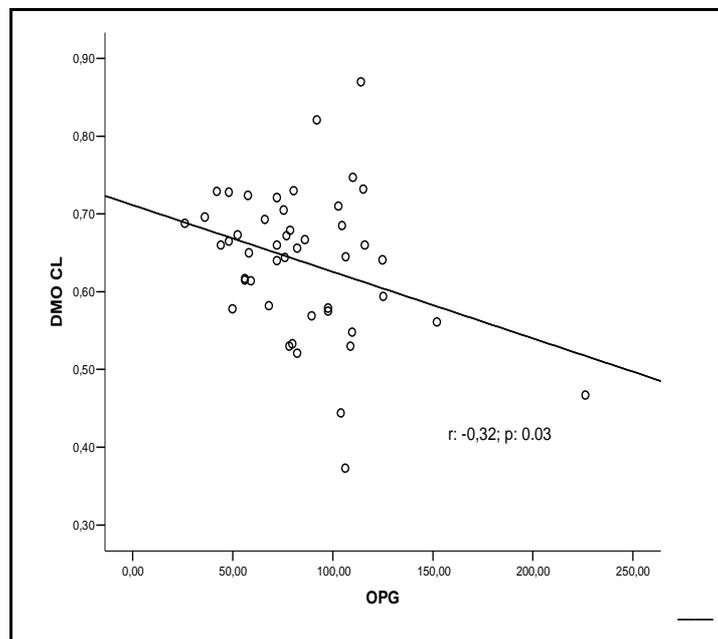


Figura 4.6.1.2. Correlación lineal simple entre OPG y DMO CF basal



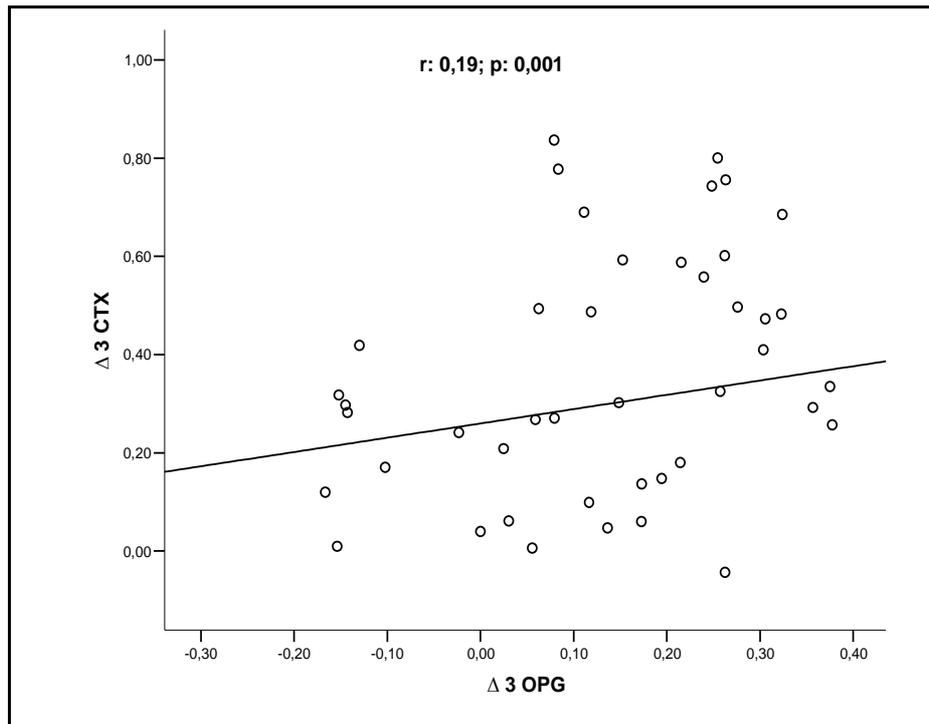
4.6.2. Correlación entre los cambios producidos en los niveles séricos de OPG, RANKL y los cambios en los marcadores de remodelado

Tabla 4.6.2. Correlación lineal simple entre los cambios producidos en los niveles séricos de OPG los cambios en los marcadores de remodelado. (p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

	CTX	CTX	CTX	bALP	bALP	bALP
	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>12 meses</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>12 meses</i>
OPG 3m	0,19**	0,15	0,42 *	0,03	-0,07	0,02
OPG 6 m	0,14	0,09	0,47 **	-0,09	-0,13	0,09
OPG 12 m	0,18	-0,01	0,20	-0,01	-0,04	-0,09
	OC	OC	OC	TRAP	TRAP	TRAP
	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>12 meses</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>12 meses</i>
OPG 3m	-0,03	-0,03	-0,01	0,01	-0,02	0,14
OPG 6 m	0,11	0,11	0,08	-0,02	0,06	0,17
OPG 12 m	-0,09	-0,08	-0,09	-0,09	0,08	0,11

Encontramos una correlación positiva entre los cambios producidos en los niveles séricos de OPG y los cambios producidos en los niveles de CTX urinario

Figura 4.6.2. Correlaciones con significación estadística entre los niveles séricos de OPG y los marcadores de remodelado.



4.6.3. Correlación entre cambios en masa ósea y cambios en OPG/RANKL

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	0,19	0,14	-0,12	-0,16	0,11	0,13
DMO CF	0,10	0,11	0,16	-0,17	0,15	-0,08
DMO CT	-0,05	0,03	0,10	0,05	-0,15	-0,15

No encontramos significación estadística entre los cambios en DMO al año de tratamiento con raloxifeno y los cambios en los niveles de OPG y RANKL a los 3, 6, 12 meses.

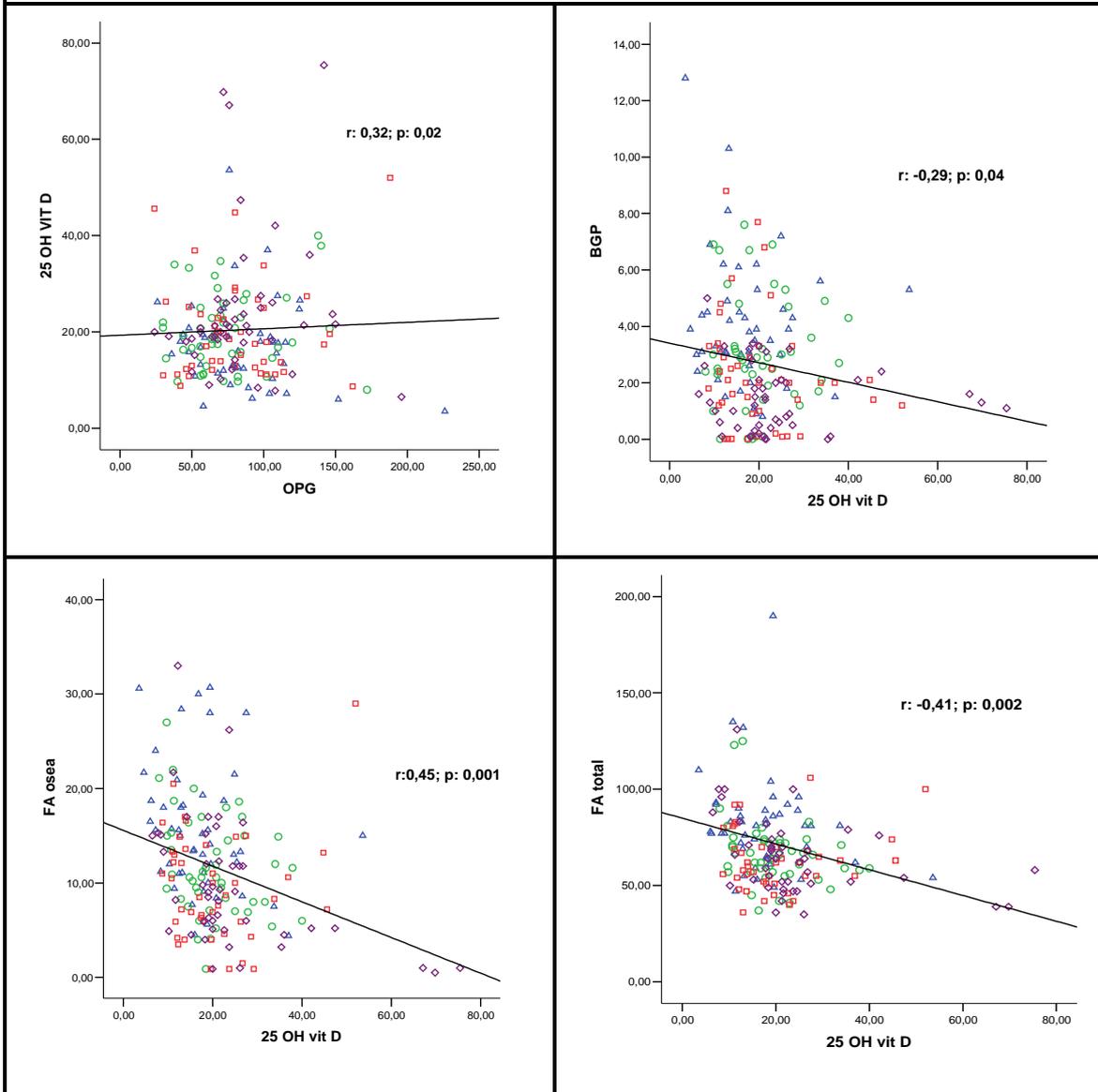
4.6.4. Análisis de pares por bloques:

En el análisis de pares por bloques se analiza la relación entre los distintos parámetros con indiferencia del tiempo de medida. Observamos un correlación positiva entre los distintos marcadores de remodelado óseo entre sí y de los marcadores con los niveles séricos de 1-25 OH vit D.

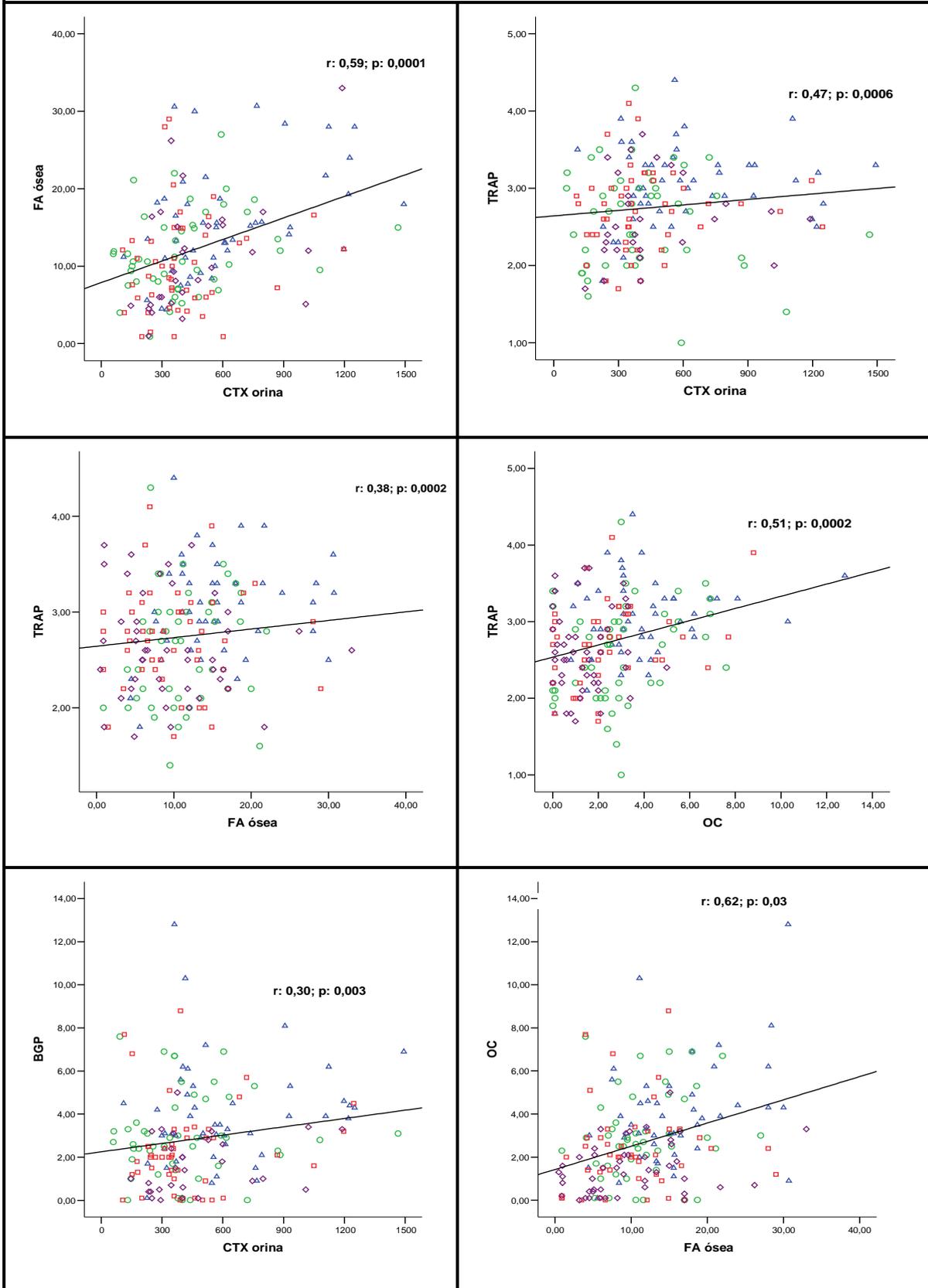
Tabla 4.6.4.1 Correlación entre niveles basales de marcadores de remodelado, OPG, RANKL, hormonas calciotropas y la DMO: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

	CTX	FAO	FAT	OC	TRAP	PTHi	VIT D	OPG
FAO	0,59***							
FAT	0,36***	0,51***						
OC	0,31*	0,62**	0,46***					
TRAP	0,47***	0,38***	0,38***	0,51***				
PTHi	-0,20	-0,13	-0,05	-0,27	-0,36*			
VIT D	-0,10	-0,46**	-0,42**	-0,29*	-0,05	0,05		
OPG	0,07	0,05	-0,10	0,16	0,31*	-0,05	0,04	
RANKL	-0,14	-0,15	-0,21	-0,09	0,030	0,14	-0,15	-0,31*
Correlación lineal simple (Pearson). Significación intergrupos: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001								

Correlaciones significativas en los pares por bloques entre marcadores hormonas calciotropas y niveles séricos de OPG. \blacktriangle basal; \circ 3 meses; \square 6 meses; \diamond 12 meses



Correlaciones significativas en los pares por bloques entre marcadores hormonas calciotropas y niveles séricos de OPG. \blacktriangle basal; \circ 3 meses; \square 6 meses; \diamond 12 meses



4. DISCUSIÓN.

El raloxifeno es un derivado benzotiofénico no esteroideo que puede clasificarse como modulador selectivo del receptor estrogénico (SERM), ya que su mecanismo de acción corresponde al de un regulador con selectividad hística de los fenómenos mediados por los receptores estrogénicos. Como consecuencia de los resultados del WHI se produjo un incremento en el uso y desarrollo de los SERMs, debido a su potencial para mantener la mayoría de los efectos beneficiosos de estrógeno mientras evita sus efectos adversos.

Raloxifeno está aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis y concretamente para la prevención de las fracturas osteoporóticas. El tratamiento con raloxifeno produce un aumento progresivo de la DMO y una reducción de los marcadores clásicos de remodelado. Sin embargo, el efecto de este fármaco sobre el sistema OPG/RANKL no se encuentra claramente establecido. En el presente estudio analizamos longitudinalmente una cohorte bien caracterizada de pacientes con osteoporosis postmenopáusica tratadas con raloxifeno durante 12 meses.

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

En nuestra población existió un elevado porcentaje de pacientes que presentaron unos niveles inadecuados de vitamina D inferiores a 30 ng/ml. Unos niveles no adecuados de vitamina D se asocian a una menor tasa de absorción de calcio, con desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y aumento del remodelado óseo. Estudios en los últimos años señalan que son necesarios niveles superiores a 30 ng/ml para evitar el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis (Heaney RP et al., 2003;

Holick MF et al., 2006). Además últimamente se ha relacionado con diversas mioquinas que aumentan la fuerza muscular y disminuyen el riesgo de caídas, especialmente en poblaciones de riesgo (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 et al., 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, después de chequear el correcto cumplimiento terapéutico.

No se encontró correlación entre los niveles de 25OH vitamina D y PTH, tanto al inicio del estudio como en los cambios producidos tras la suplementación.

5.2. Cambios en densidad mineral ósea.

En nuestro estudio, el tratamiento con raloxifeno aumentó la densidad mineral ósea de manera significativa en columna lumbar un 2,64 %, con significación estadística respecto a la situación basal. En cuello femoral y cadera total la DMO también aumentó un 0,1 y 0,9 % respectivamente aunque estos cambios no alcanzaron la significación estadística. En estudios previos, el promedio de cambio descrito para el tratamiento con raloxifeno está entre 1-3% dependiendo de la localización y de la duración del tratamiento (Siris ES et al., 2005; Barrett-Connor et al., 2006). 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 (60.5%) que en cuello femoral (49%) y cadera total (44%). No obstante, varios estudios sugieren que las pacientes en tratamiento con raloxifeno experimentan una reducción en el riesgo de fracturas vertebrales con independencia de los cambios en la DMO comparada con placebo, por lo que incluso este subgrupo de pacientes se verían beneficiadas en términos de reducción de fracturas (Fontana et al., 2003).

En las pacientes con fracturas osteoporóticas prevalentes no presentaron diferencias significativas con la pacientes no fracturadas respecto a la ganancia de masa ósea.

5.3. Cambios en marcadores de remodelado.

El tratamiento con raloxifeno en mujeres con osteoporosis posmenopáusicas induce una moderada reducción de los marcadores de remodelado, patente a los 3 meses de tratamiento y que se mantiene a los 6 y 12 meses del inicio del mismo. El porcentaje de reducción varía para cada marcador, siendo el descenso medio de CTX urinario del 25-40%. El descenso medio para fosfatasa alcalina ósea es del 15-20% y 20% osteocalcina (Fontana et al., 2003).

En nuestro grupo de estudio el tratamiento con raloxifeno produjo una reducción de los niveles séricos y urinarios de los diferentes marcadores de remodelado similar a la descrita en estudios clínicos previos. La reducción más importante fue para los niveles de CTX urinario con un marcado descenso a los 3 meses (32% respecto a valores basales) de tratamiento que se mantuvo durante el seguimiento (31% y 30% a los 6 y 12 meses de tratamiento respectivamente). Los valores de fosfatasa alcalina ósea descendieron en torno al 26% desde los tres meses de tratamiento y se mantuvieron durante la duración del estudio, 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.

En nuestro estudio, los niveles basales de CTX urinario se correlacionaron de forma negativa con la masa ósea a nivel de columna lumbar expresada en términos DMO. Esto apoya la utilidad de los marcadores de remodelado óseo como herramienta que complementa el uso de los marcadores de remodelado óseo en el diagnóstico de osteoporosis y la predicción del riesgo de fractura (Miller PD et al., 2005).

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 osteoporosis y 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 son concordantes con los estudios previamente publicados.

5.4. Sistema OPG/RANKL

En nuestro estudio, los niveles basales de OPG se correlacionan de manera positiva con la edad, lo cual está en concordancia con algunos estudios publicados (Khosla S et al., 2002; Szulz P et al., 2001; Kudlacek S et al., 2003). El aumento con la edad puede reflejar un incremento en la producción de OPG en el curso de procesos patológicos como la osteoporosis y la aterosclerosis, como también una disminución en el aclaramiento renal.

Además encontramos una correlación negativa entre los niveles séricos de OPG y la masa ósea expresada en términos de DMO y Tscore. Estos datos van acordes con otros estudios publicados, pero esta relación es mucho menos consistentes que la relación con la edad. Los niveles séricos de OPG resultaban superiores en las mujeres osteoporóticas respecto a una población de mujeres mayores no osteoporóticas (Yano et al., 1999;

Kudlaceck et al., 2003). Otros, en cambio, han encontrado correlación positiva entre OPG y DMO (Khosla S, 2002; Browner WS, 2001). El hallazgo de una correlación inversa se ha interpretado de manera concordante como expresión de un mecanismo compensatorio inadecuado.

Nosotros no encontramos diferencias significativas en los niveles basales de OPG entre las pacientes con fractura y sin fractura, lo que coincide con resultados previos (Mezquita-Raya et al., 2005), aunque difieren 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.

Las concentraciones séricas de RANKL fueron indetectables (RANKL = 0) en un alto porcentaje de pacientes. Este porcentaje de valores indetectables, es similar al aportado por otros autores que usaron el mismo ensayo que nosotros ELISA RANKL (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria). Se obtuvieron un alto porcentaje de valores indetectables tanto en mujeres postmenopausicas (Mezquita et al., 2005; Bashir et al., 2006), como en otros tipos de patologías que incluyen embarazo, cirrosis biliar primaria, enf. de Wilson, y en sujetos sanos (Naylor et al., 2003; Hegedus et al., 2002; Szalay et al., 2003).

5.5. Cambios en sistema OPG/RANKL tras la administración de raloxifeno.

Los estudios realizados hasta ahora sobre el efecto del tratamiento con raloxifeno sobre el sistema OPG-RANKL son contradictorios y no

concluyentes. Estudios *in vitro* realizados en cultivos celulares con diferentes concentraciones de raloxifeno mostraron cambios significativos en los niveles de OPG y RANKL a pesar de inducir una inhibición de la actividad osteoclástica. Sin embargo, los resultados de estos estudios fueron diametralmente opuestos (Viereck V et al., 2003; Cheung J et al., 2003). Así, Viereck et al. diseñaron un estudio *in vitro* donde analizaron el efecto de la administración de raloxifeno sobre un cultivo de osteoblastos humanos. Determinaron los niveles de OPG, IL-6 y la expresión de ARN mensajero de la OPG. En este estudio, la administración de raloxifeno produjo un aumento tanto de los niveles de OPG como la expresión de ARN mensajero de OPG de un modo dosis y tiempo dependiente, similar al establecido por 17β estradiol. Además raloxifeno produjo una disminución significativa de los niveles de IL-6. Ellos concluyen que el efecto de raloxifeno sobre los osteoblastos podría estar mediado por el efecto estimulador de la diferenciación sobre los mismos. En el otro estudio *in vitro* publicado, Cheung et al. evaluaron los efectos en cultivos de osteoblastos humanos de la administración de raloxifeno o 17β estradiol. Determinaron los cambios en las concentraciones de IL-6, IL- 1α , IL- 1β , OPG y RANKL además de la expresión de ARN mensajero de OPG y RANKL. La administración de raloxifeno produjo un descenso significativo de los niveles de las interleuquinas y OPG. Los cambios en los niveles de RANKL no fueron valorados debido a su baja concentración. Se produjo además un descenso en la expresión de ARN mensajero de OPG y RANKL en el grupo al que se le administró raloxifeno respecto al control.

Los pocos estudios publicados *in vivo* también difieren en sus resultados. Es de destacar el estudio publicado por Bashir et al. en 2005. En un estudio prospectivo, reclutaron a 29 pacientes bien caracterizadas con osteoporosis

postmenopausica sin tratamiento y las asignaron a la administración de raloxifeno (n: 19) o estrógenos (n: 10) más suplementos de calcio y vitamina D. Determinaron a niveles séricos de OPG, RANKL y CTX al mes y a los 3, 6 y 12 meses. Además determinaron ARN mensajero de OPG y RANKL de células mononucleares periféricas. Se diseñó además una parte del estudio *in vivo* donde se generaron osteoclastos a partir de células mononucleares periféricas en cultivo. En el apartado de resultados, la administración de raloxifeno produjo cambios similares a los aparecidos en los grandes estudios en lo referente a DMO y cambios en CTX sérico. Dentro de los cambios dentro de los marcadores de osteoclastogénesis, el estudio de los niveles de RANKL mostró un nivel de determinaciones indetectables cercano al 50%. En aquellos con niveles detectables se produjo un descenso significativo a partir de los 6 meses de la administración de raloxifeno. Los niveles de OPG disminuyeron de manera significativa respecto a los niveles basales a partir del mes de tratamiento. Respecto a la expresión de ARN mensajero se produjo un descenso significativo a los 6 meses en los niveles de RANKL y a partir de los 3 meses en los niveles de OPG en el estudio *in vivo*, corroborado con los descensos en la expresión de estas proteínas en los cultivos *in vitro*.

El último estudio clínico es un diseño prospectivo randomizado y controlado por placebo donde se administró raloxifeno (n: 19) o placebo (n: 18) durante 6 meses a mujeres postmenopausicas con Tscore ≤ -1 . La administración de raloxifeno produjo un aumento significativo de los niveles de OPG respecto al basal, no existiendo cambios respecto al placebo. Además la administración de raloxifeno no produjo cambios significativos en los niveles de CTX respecto al basal ni cambios en la masa ósea.

Nuestros resultados, donde se produce un descenso significativo de los niveles de OPG sérica tanto a los tres como a los 6 meses son acordes con lo publicados por Bashir et al. en 2005. Además de administrar raloxifeno mas suplementos de calcio y vitamina D a una cohorte bien caracterizada similar a la nuestra, refrendan los datos con la disminución de la expresión de ARN mensajero de la OPG y a la par confrontan estos resultados con un diseño *in vitro*. En concordancia con nuestros resultados, apoyan la hipótesis de que la reducción en los niveles de OPG son un reflejo de la inhibición en el remodelado óseo además de un efecto indirecto de raloxifeno sobre otras vías de actuación que incluyen la inhibición de IL-6 y TNF.

La disminución discreta y poco consistente de los niveles de OPG en nuestro estudio puede explicarse por diversas razones. En primer lugar, por las limitaciones de sensibilidad y especificidad que han mostrado los ensayos de OPG. 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, 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 (Rogers A et al., 2005).

En nuestro estudio, debido probablemente al elevado porcentaje de RANKL indetectables, sólo encontramos diferencias al comparar concentraciones medias de RANKL en suero tras la administración de raloxifeno a los 12 meses. De igual forma, tampoco encontramos asociación alguna entre la concentración sérica de RANKL y la DMO o marcadores de remodelado óseo. Estos datos apoyan la dificultad de la determinación de RANKL para caracterizar a las pacientes con riesgo de

osteoporosis y de fractura osteoporótica. Pennisi et al. (2003), no encontraron diferencias significativas en los niveles de RANKL entre pacientes con enfermedad vascular y baja masa ósea frente a controles, y concluyen que es difícil sacar conclusiones acerca del papel del sistema OPG/RANKL en pacientes con arteriosclerosis basados en determinaciones séricas.

Por esta misma razón, el ratio OPG/RANKL tuvo poco valor, y sólo encontramos una tendencia a la significación a los 12 meses de la administración de tratamiento. Un dato consistente dentro de la fisiopatología ósea actual es que no son los niveles totales de OPG y RANKL, sino su ratio los que explican las alteraciones óseas. Sin embargo, la dificultad en la determinación del RANKL no nos ha permitido obtener conclusiones consistentes en este sentido.

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

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 (Greenspan SL et al., 2005). En nuestro estudio, los niveles basales de marcadores clásicos de remodelado y más concretamente el CTX urinario se correlacionó de manera negativa con la densidad mineral ósea. Estos datos no son del todo consistentes en la literatura (Fink E et al., 2000; Greenspan SL et al., 2000), debido entre otra cosas a la variabilidad de los marcadores de remodelado. 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.

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 raloxifeno.

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 (Szulc 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 esten 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 han 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 encontramos una relación inversa entre los valores basales de CTX urinario y OPG.

6. CONCLUSIONES.

1. En mujeres con osteoporosis postmenopáusica el tratamiento con raloxifeno (60 mg/día) 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 raloxifeno.

4. Las concentraciones urinarias de CTX se correlaciona de manera inversa con la DMO CL, lo que indica el papel predictor de este marcador de resorción para la identificación de mujeres postmenopausicas con riesgo de osteoporosis.

5. El tratamiento con raloxifeno produce un descenso discreto de los valores séricos de OPG. El patrón de disminución de esta proteína puede ser tanto un reflejo del descenso del remodelado óseo como un efecto indirecto del raloxifeno sobre distintas vías de acción, no pudiendose demostrar en el periodo de estudio una acción directa de raloxifeno sobre el

sistema OPG/RANK/RANKL en mujeres con osteoporosis postmenopáusica.

6. El tratamiento con raloxifeno parece producir cambios en los niveles séricos de RANKL, pero la baja rentabilidad de los kits usados en la actualidad, dado el alto porcentaje de determinaciones indetectables, dificulta la consecución de conclusiones, por lo que es desaconsejable la determinación de los niveles séricos de RANKL al menos en este tipo de población.

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

Alarcon Alarcon T, Gonzalez-Montalvo JI. Osteoporotic hip fracture. Predictive factors of short-and long-term functional recovery. *An Med Interna.* 2004 Feb;21(2):87-96.

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

Allen MR, Iwata K, Sato M, Burr DB. Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density. *Bone* 2006, 39:1130-1135.

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.

Barrett-Connor E, Lori Mosca, Peter Collins., Mary Jane Geiger, Deborah Grady, Marcel Kornitzer, M.D., Michelle A. McNabb, M.S., and Nanette K. Wenger, Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women.. *N Eng J Med* 2007. 348: 618-29

Bashir A, Mak YT, Sankaralingam S, et al. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids* 2005, 70 (13): 847-55.

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi HM, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001;16:348–360.

Benhamou CL. Effects of osteoporosis medications on bone quality. *Joint Bone Spine.* 2007 Jan;74(1):39-47.

Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Leib ES, Lewiecki EM, Petak SM. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2005 position development conference. *J Clin Densitom.* 2006;9:4-14.

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

Bjarnason NH, Sarkar S, Duong T, Mitlak B, Delmas PD, Christiansen C. Six and twelve month changes in bone turnover are related to reduction

in vertebral fracture risk during 3 years of raloxifene treatment in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2001b; 12:922–30.

Black DM, Palermo L, Nevitt MC, Genant HK, Epstein R San ValenR, et al for The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Comparison of methods for defining prevalent Vertebral deformities: The Study of Osteoporotic Fractures.) *Bone Miner Res.* 1995;10:890-902.

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.

Blake GM, Park-Holohan S-J, Fogelman I. Quantitative studies of bone in postmenopausal women using ¹⁸F-fluoride and ^{99m}Tc-Methylene diphosphonate. *J Nucl Med.* 2002;43:338-45

Bonnick SL, Shulman L. Monitoring osteoporosis therapy: density, bone turnover markers, or both? *Am J Med.* Bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med.* 2006; 19 4 Suppl 1:S25-31.

Bonnick SL, Shulman L. Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med.* 2006 Apr;119(4 Suppl 1):S25-31.

Bouxsein ML. Bone quality: an old concept revisited. *Osteoporos Int.*2003;14Supl5:S1-S2.

Bouxsein ML. Determinants of skeletal fragility. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19:897-911.

Boyle WJ, Scott Simonet W, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-42.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.

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 osteoprotegerina levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:631-637.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389:753-8.

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.

C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteopor Int* 2002; 13:394-399.

Cadarette SM, Jaglal SB, Murray TM, McIsaac WJ, Joseph L, Brown JP; Canadian Multicentre Osteoporosis Study. Evaluation of decision rules for referring women for bone densitometry by dual-energy x-ray absorptiometry. *JAMA*. 2001;286(1):57-63

Cheung J, Mak YT, Papaioannou SI, Evans BA, Fogelman I, Hampson G. Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. *J Endocrinol* 2003, 177:423-33

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.

Cook GJR, Lodge MA, Blake GM, Marsden PK, Fogelman I. Differences in skeletal kinetics between vertebral and humeral bone measured by ¹⁸F-fluoride positron emission tomography in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2000;15:763-9.

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

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- β)-binding protein by osteoclasts: A

mechanism for release of TGF- β from bone matrix. *J Biol Chem* 2002; 277: 21352-2160.

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 metaanalysis. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 1330-8.

De Rosa M, Paesano L, Nuzzo V, et al. Bone mineral density and bone markers in hypogonadotropic and hypergonadotropic hypogonadal men after prolonged testosterone treatment. *J Endocrinol Invest* 2001;24:246–52.

Delmas PD, Ensrud KE, Adachi JD, Harper KD, Sarkar S, Gennari C, Reginster JY, Pols HA, Recker RR, Harris ST, Wu W, Genant HK, Black DM, Eastell R. Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002. 87:3609-3617

Delmas PD, Genant HK, Crans GG, Stock JL, Wong M, Siris E, Adachi JD. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures: results from the MORE trial. *Bone* 2003, 33:522-532

Delmas, P.D. et al. Effects of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-years results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3609-3617.

Díez A, Puig J, Nogués X, Knobel H, Mínguez S, Supervia A, et al. Cribado de riesgo óseo mediante factores clínicos en mujeres tras menopausia fisiológica. *Med Clin* 1998; 110:121-4.

Eastell R. Et al. The effects of raloxifeno on incident vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: 4-year results from the MORE trial *Journal of Bone & Mineral Research* 2000; 15(Supp.1):S229.

Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes TheNSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial. *JAMA*, 2006. 295, No. 23.

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.

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.

Ettinger B, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 1999; 282 (7): 637-45.

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

Faulkner KG. Bone matters: Are density increased necessary to reduce fracture risk ?. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 183-187.

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.

Ferrar L, Jiang G, Adams J, Eastell R. Identification of vertebral fractures: an update. *Osteoporos Int.* 2005;16:717-28.

Fiore CE, Pennisi P, Tandurella FG, et al. Response of biochemical markers of bone turnover to estrogen treatment in post-menopausal women: evidence against an early anabolic effect on bone formation. *J Endocrinol Invest* 2001;24:423-9.

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

Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drakel FH, Mc Quensey S, 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.

Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL, Halleen JM, Hellman J, Isaksson A, Pettersson K, Vaananen HK, Akesson K, Obrant KJ. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. J Bone Miner Res. 2004 Mar; 19(3):386-93.

Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). Exp Hematol. 2004 Aug; 32(8):685-91.

González Macías J., Riancho Moral JA. Osteoporosis. Concepto. Epidemiología. Etiología. Manifestaciones clínicas y complicaciones Medicine. 2006; 09:3873-9.

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

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

Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (SEIOMM). Osteoporosis postmenopáusica. Guía de práctica clínica. Versión resumida. REEMO. 2002; 11:67-78. 2002; 11:67-78.

Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α , 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

Hamdy NA. Targeting the RANK/RANKL/OPG signaling pathway: a novel approach in the management of osteoporosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007 Apr;8(4):299-303.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast función and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423:340-55.

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 R. Is the paradigm shifting? *Bone.* 2003;33:457-64. 5:67-72.

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 reumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 527-530.

Heider U, Fleissner C, Zavrski I, Kaiser M, Hecht M, Jakob C, Sezer O. Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(11):1544-53.

Heider U, Hofbauer LC, Zavrski I, Kaiser M, Jakob C, Sezer O. Novel aspects of osteoclast activation and osteoblast inhibition in myeloma bone disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 16; 338(2):687-93.

Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. *Bone*. 2006 Dec;39(6):1173-81.

Hla MM, Davis JW, Ross PD, Yates AJ, Wasnich RD. The relation between lifestyle factors and biochemical markers of bone turnover among early postmenopausal women. *Calcifield Tissue*. 2001. 68(5):291-6.

Hofbauer L, Kuhne CA, Viereck V. Clinical implications of OPG/RANK/RANKL system or bone and vascular diseases. *JAMA* 2004. 292: 40-5

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 vitamine 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.

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.

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.

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.

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.

Jodar Gimeno E, Martínez Díaz-Guerra G, Hawkins Carranza F. Escalas de riesgo de osteoporosis. *REEMO.* 2005;14:81-5.

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

Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, de Late C, Delmas P, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1185-94.

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

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

Kanis JA, Black D, Cooper C, Dargent P, Dawson-Hugues B, de Late C, et al. Un nuevo enfoque para el desarrollo de las pautas de evaluación para osteoporosis. *REEMO*. 2003;12:30-9.

Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, et al. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int*. 2005;16:581-9.

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 metaanalysis. *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, Johnell O, Oden A, Johansson H, Eximan, JA, Fujiwara S, et al. The use of múltiple sites for the diagnosis of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2006;17:527-34.

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.

Karsenty G. Convergente between bone and energy homeostasis: leptin regulation of bone mass. *Cell Metabolism* 2006. 4:341-8.

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.

Kazakia GJ, Majumdar S. New imaging technologies in the diagnosis of osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Jun;7(1-2):67-74.

Kehoe T. Bone quality: a perspective from the Food and Drug Administration. *Curr Osteoporos Rep.* 2006 Jun;4(2):76-9.

Khosla S. Leptin central or peripheral to the regulation of bone metabolism?. *Endocrinology* 2002; 143, 4161-4.

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

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.

Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, et al. Regulator! Of bone mass in mice by the lipoxygenase gene *AIox1S*. *Science.* 2004;303:229-32.

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.

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 trtranscriptional activity. *Cell* 2001; 104: 719-730.

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 trtranscriptional 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.

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.

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

Lofman O, Magnusson P, Toss G, Larsson L. Common biochemical markers of bone turnover predict future bone loss: A 5-year follow-up study. *Clin Chim Acta.* 2005;356:67-75.

Lofman O, Magnusson P, Toss G, Larsson L. Common biochemical markers of bone turnover predict future bone loss: a 5-year follow-up study. *Clin Chim Acta.* 2005 Jun;356(1-2):67-75.

Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo C, Kolls JK, Joosten L A., van den Berg W. IL-17 Promotes Bone Erosion in Murine Collagen-Induced Arthritis Through Loss of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin Balance. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2655-62.

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.

Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol.* 2005 ;175:917-25.

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.

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

Marcus R, Holloway L, Wells B, et al. The relationship of biochemical markers of bone turnover to bone density changes in postmenopausal women: results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial. *J Bone Miner Res* 1999;14:1583–95.

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

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

McDonnell P, McHugh PE, O'Mahoney D. Vertebral osteoporosis and trabecular bone quality. *Ann Biomed Eng.* 2007 Feb;35(2):170-89

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.

Messalli EM, Mainini G, Scaffa C, et al. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 2007, 56: 38-44.

Mezquita Raya P, Muñoz Torres M, de Dios Luna J, Lopez Rodríguez 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.

Midtby M, Magnus JH, Joakimsen RM. The Tromso Study: a population-based study on the variation in bone formation markers with age, gender, anthropometry and season in both men and women. *Osteoporos Int* 2001;12:835-43.

Miller PD, Hochberg MC, Wehren LE, Ross PD, Wasnich RD. How useful are measures of BMD and bone turnover? *Curr Med Res Opin.* 2005 Apr;21(4):545-54.

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

Muller R, van Lenthe GH. Trabecular bone failure at the microstructural level. *Curr Osteoporos Rep.* 2006 Jun;4(2):80-6.

Mundy GR, Chen D, Oyajobi BO. Bone remodelling. En: Favus MJ, editor. *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Washington: American Society for Bone and Mineral Research 2003. p. 46-57.

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.

Murphy MG, Weiss S, McClung M, et al. Effect of alendronate and MK-677 (a growth hormone secretagogue), individually and in combination, on markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1116–25.

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.

Nakaoka D, Sugimoto T, Kaji H, et al. Determinants of bone mineral density and spinal fracture risk in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int* 2001;12:548–54.

Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Rodriguez-Rebollar A, Cannata-Andia JB. Determinants of incidence of osteoporotic fractures in the female Spanish population older than 50. *Osteoporos Int*. 2005 Dec;16(12):2013-7.

Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Rodriguez-Rebollar A, Serrano-Arias M, Cannata-Andia JB. Prevalence of osteoporosis in men and determinants of changes in bone mass in a non-selected Spanish population. *Osteoporos Int*. 2005 Jun;16(6):603-9.

Nelson HD, Helfand M, Wolf SH, Alian JD. Screening for postmenopausal osteoporosis: A review of the evidence for the US Preventive Services Task Forcé. *Ann Intern Med.* 2002;137:529-41.

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

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.

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

Ott SM, Oleksik A, Lu Y, Harper K, Lips P. Bone histomorphometric and biochemical marker results of a 2-year placebo-controlled trial of raloxifene in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2002;17:341-8.

Paige LA, Christensen DJ, Grøn H, et al. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ERa and ERb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 3999-4004.

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

Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res.* 2001;16:1821-8.

Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, Turner CH, Duncan RL, Bidwell JP. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *J Cell Biochem.* 2003;88:104-12.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor b acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000;19:4970-8.

Piert M, Zittel TT, Becker GA, Jahn M, Stahlschmidt A, Maier G, et al. Assessment of porcine bone metabolism by dynamic ¹⁸F-fluoride PET: Correlation with bone histomorphometry. *J Nucl Med.* 2001;42:1091-100.

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

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

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.

Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and TNF α -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.

Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005 Dec; 115(12):3318-25.

Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003;32:15-24.

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

Riggs BL, Hartmann LC. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *New England Journal of Medicine.* 2003. 348:1192.

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

Riggs BL, Melton LJ, 3rd Bone turnover matters: the raloxifene treatment paradox of dramatic decreases in vertebral fractures without commensurate increases in bone density. *J Bone Miner Res* 2002, 17:11-14

Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor Kb ligand: Clinical utility in metabolic bone disease assesment. *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* 2002; 87: 4470-5.

Roggia C, Tamone C, Cenci S, Pacifici R, Isaia GC. Role of TNF- α 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

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized. *JAMA* 2002.

Roux C, Carnero P, Thomas T, Sabatier JP, Orcel P, Audran M Comité Scientifique du GRIO. Recommendations for monitoring anti-resorptive therapies in postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine.* 2005 ;72 :26-31.

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 CD. Emerging concepts in osteoporosis and bone strength. *Curr Méd Res Opin.* 2005;21:1049-56.

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.

S. Bord, D.C. Ireland, S.R. Beavan, J.E. Compston. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003; 32: 136-141

Sarkar S, Mitlak BH, Wong M, Stock JL, Black DM, Harper KD Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Miner Res* 2002, 17:1-10

Sarkar S, Reginster JY, Crans GG, Díez-Pérez A, Pinette KV, Delmas PD. Relationship between changes in biochemical markers of bone turnover and BMD to predict vertebral fracture risk. *J Bone Miner Res.* 2004;19:394-40.

Schevde N, Bendixen A, Maruyama M, Pike J. Estrogen inhibits RANKL stimulated osteoclastogenesis in isolated murine myeloid progenitors and the monocyte-macrophage cell line RAW 264-7. *J Bone Miner Res* 1999; 14(Suppl 1):S: 150.

Schwartzman J, Yazici Y. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2006 Jun 1;354(22):2390-1

Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet.* 2002;359:1841-50.

Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2003. 32(1): 83-113

Seifert-Klauss V, Mueller JE, Luppá P, et al. Bone metabolism during the perimenopausal transition: a prospective study. *Maturitas* 2002;41:23–33.

Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465-8. 18. Keating NL, Cleary PD, Rossi AS, Zaslavsky AM, Ayanian JZ. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. *Ann Intern Med* 1999;130:545-53.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, et al. The structural basis of estrogen receptor/ coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998; 95:927-37.

Shoback D. Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2007. 7, 289-300.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, De Rose

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.

Siris ES, Harris ST, Eastell R, Zanchetta JR, Goemaere S, Diez-Perez A, Stock JL, Song J, Qu Y, Kulkarni PM, Siddhanti SR, Wong M, Cummings SR. Skeletal effects of raloxifene after 8 years: results from the continuing outcomes relevant to Evista (CORE) study. *J Bone Miner Res* 2005;20:1514-1524

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.

Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 2005 Oct;20(10):1813-9

Sornay-Rendu E, Muñoz F, Carnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1813-9.

Srivastava AK, Vliet EL, Lewiecki EM, Maricic M, Abdelmalek A, Gluck O, Baylink DJ. Clinical use of serum and urine bone markers in the management of osteoporosis. *Curr Med Res Opin.* 2005 Jul;21(7):1015-26.

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

Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):3002-7.

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.

Stepan JJ. Prediction of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2000; 1 Suppl 6:S45-S4. 24. Gerdhem P, Ivaska KK, Mátao SL, Halleen JM, Heuman J, Isaksson A, et al. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Miner Res*. 2004;19: 386-93 26.

Stepan JJ. Clinical utility of bone markers in the evaluation and follow-up of osteoporotic patients: why are the markers poorly accepted by clinicians? *J Endocrinol Invest*. 2003 May;26(5):458-63.

Stroup GB, Hoffman SJ, Vasko-Moser JA, et al. Changes in bone turnover following gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist administration and estrogen treatment in cynomolgus monkeys: a short-term model for evaluation of antiresorptive therapy. *Bone* 2001;28:532-7.

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.

Takahashi M, Wehrli FW. Micro MRI of trabecular bone. *Clin Calcium.* 2004;14:47-54.

Wehrli FW, Leonard MB, Saha PK, Gomberg BR. Quantitative high-resolution magnetic resonance imaging reveals structural implications of renal osteodystrophy on trabecular and cortical bone. *J Magn Reson Imaging.*2004;20:83-9.

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation. *7 Raisz LG.* Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115:3318-25.

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

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

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.

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.

Viereck V, Grundker C, Blashke S, et al. Raloxifene Concurrently Stimulates Osteoprotegerin and Inhibits Interleukin-6 Production by Human Trabecular Osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(9): 4206-13.

Walsh B, Kuller L, Wild R Paul S, Farmer R, Lawrence J, Shah A, Anderson P. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 1998; 279: 1444-1451.

Walsh B, Paul S, Wild A, Dean RA, Tracy RP, Cox DA. The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 214-218.

Watts NB, Jenkins DK, Visor JM, Casal DC, Geusens P. Comparison of bone and total alkaline phosphatase and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate. *Osteoporos Int* 2001;12:279–88.

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

Wilkie JR, Giger ML, Chinander MR, Vokes TJ, Li H, Dixon L, et al. Comparison of radiographic texture analysis from computed radiography and bone densitometry systems. *Med Phys*. 2004;31:882-91.

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003 Dec 1;22(23):6267-76.

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.

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 α . *Arthritis Rheum* 2002; 46:1744-1753.

Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Günter Steiner G, Smolen J, Schett G. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on

synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan; 50(1):277-90.