

PROGRAMA DE DOCTORADO  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRIA



## **Tesis Doctoral. Año 2011**

Estudio de la distribución de determinados polimorfismos de un solo nucleótido de los genes *OPG*, *RANK*, *RANKL*, *GNAS1* y *CLDN14* y su relación con la densidad mineral ósea y diversos marcadores de remodelación ósea en el hiperparatiroidismo primario

**María Piedra León**

**Licenciada en Medicina**

**Directores: Dr. José Antonio Amado Señaris  
Dra. M<sup>a</sup> Teresa García Unzueta**

# Índice

I. LISTADO DE ABREVIATURAS	pag 8
II. INTRODUCCIÓN	pag 13
1. ESTRUCTURA, REGULACIÓN Y REMODELACIÓN DEL HUESO	pag 14
1. 1. Estructura y desarrollo del hueso	pag 14
1. 2. Homeostasis del calcio	pag 17
1. 2. 1. Calcio	
1. 2. 2. Fósforo	
1. 3. Remodelación del hueso adulto	pag 20
1. 4. Regulación hormonal de la remodelación ósea	pag 21
1. 4. 1. Regulación paracrina	
1. 4. 2. Regulación endocrina	
1. 4. 2. 1. PTH	
1. 4. 2. 1. 1. Síntesis y secreción de la PTH	
1. 4. 2. 1. 2. Receptor de PTH y PTHrp	

1. 4. 2. 1. 3. Metabolismo de la PTH	
1. 4. 2. 1. 4. Acción de la PTH en el riñón	
1. 4. 2. 1. 5. Acción de la PTH en el hueso	
1. 4. 2. 2. Vitamina D	
1. 4. 2. 3. Calcitonina	
1. 4. 2. 4. Hormonas sexuales	
1. 4. 2. 5. Hormonas tiroideas	
1. 4. 2. 6. GH e IGF-1	
1. 4. 2. 7. Glucocorticoides	
2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL METABOLISMO FOSFO-CÁLCICO	pag 39
2. 1. Determinaciones analíticas generales	pag 39
2. 1. 1. Calcio total	
2. 1. 2. Calcio iónico	
2. 1. 3. Fósforo	
2. 1. 4. Fosfatasa alcalina total	
2. 1. 5. Metabolitos de la vitamina D	
2. 1. 6. PTH	
2. 2. Marcadores de remodelación ósea	pag 44
2. 2. 1. Limitaciones	
2. 2. 2. Utilidad clínica	
2. 2. 3. Marcadores bioquímicos de formación ósea	
2. 2. 3. 1. Fosfatasa alcalina (FA)	
2. 2. 3. 2. Osteocalcina	
2. 2. 3. 3. Propéptidos del Colágeno tipo 1	

2. 2. 4. Marcadores bioquímicos de resorción ósea	
2. 2. 4. 1. Hidroxiprolina	
2. 2. 4. 2. Piridinolinas	
2. 2. 4. 3. Telopéptido aminoterminal del Colágeno tipo 1 (NTX)	
2. 2. 4. 4. Telopéptido carboxiterminal de la cadena alfa 1 del Colágeno tipo 1 (Crosslaps $\beta$ , CTX).	
2. 2. 4. 5. Sialoproteína del hueso	
2. 2. 4. 6. Fosfatasa ácida tartrato resistente	
3. EVALUACIÓN RADIOLÓGICA ÓSEA	pag 54
3. 1. Radiología convencional	pag 54
3. 2. Tomografía axial computerizada (TC)	pag 54
3. 3. Densitometría ósea	pag 55
4. HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO	pag 57
4. 1. Definición	pag 57
4. 2. Etiología y fisiopatología	pag 57
4. 3. Incidencia y prevalencia del HPP	pag 60
4. 4. Manifestaciones Clínicas del HPP	pag 61
4. 4. 1. Afectación ósea	
4. 4. 2. Manifestaciones renales	
4. 4. 3. Otras manifestaciones	
4. 5. Diagnóstico del HPP	pag 68
4. 5. 1. Calcio y PTH	

4. 5. 2. Vitamina D	
4. 5. 3. Fósforo y FGF-23	
4. 5. 4. Evaluación de afectación sistémica	
4. 5. 5. Estudios de imagen o localización	
4. 6. Tratamiento del HPP	pag 73
4. 6. 1. Tratamiento quirúrgico del HPP	
4. 6. 2. Tratamiento médico o no quirúrgico del HPP	
4. 6. 2. 1. Recomendaciones generales	
4. 6. 2. 2. Tratamiento farmacológico	
4. 6. 2. 2. 1. Estrógenos	
4. 6. 2. 2. 2. Fosfato oral	
4. 6. 2. 2. 3. Bifosfonatos	
4. 6. 2. 2. 4. Calcimiméticos	
4. 6. 2. 3. Inyección percutánea de alcohol	
4. 6. 2. 4. Ultrasonidos de alta intensidad	
5. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP) DE LOS GENES A ESTUDIAR Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO ÓSEO	pag 85
5. 1. Introducción	pag 85
5. 2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	pag 87
5. 3. SNP de los genes del sistema de citocinas OPG/RANKL y su relación con la DMO	pag 87
5. 3. 1. Estudio del SNP 1181 G/C del gen <i>OPG</i>	
5. 3. 2. Estudio del SNP 163 A/G del gen <i>OPG</i>	
5. 3. 3. Estudio del SNP 245 T/G del gen <i>OPG</i>	

5. 3. 4. Estudio de SNPs del gen <i>RANK</i>	
5. 3. 5. Estudio de SNPs del gen <i>RANKL</i>	
5. 4. Estudio del SNP 393 T/C del gen <i>GNAS1</i>	pag 95
5. 5. Estudio del SNP rs219780 del gen <i>CLDN 14</i>	pag 98
III. OBJETIVOS	pag 101
1. OBJETIVO GENERAL	pag 102
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	pag 103
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	pag 104
1. SELECCIÓN DE PACIENTES, RECOGIDA DE DATOS Y TOMA DE MUESTRAS	pag 105
1. 1. Selección de pacientes	pag 105
1. 2. Recogida de datos	pag 107
1. 3. Toma de muestras	pag 108
2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y METODOLOGÍA	pag 108
2. 1. Determinaciones analíticas generales	pag 109
2. 2. Determinaciones analíticas específicas	pag 110
2. 3. Análisis de discriminación alélica	pag 112
3. DENSITOMETRÍA ÓSEA	pag 116
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	pag 117

V. RESULTADOS	pag 119
1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	pag 120
2. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA POBLACIONAL	pag 124
3. ANÁLISIS GENOTÍPICO	pag 128
3. 1. SNP 163 A/G del gen de <i>OPG</i>	
3. 2. SNP 245 T/G del gen de <i>OPG</i>	
3. 3. SNP 1181 G/C del gen de <i>OPG</i>	
3. 4. SNP rs2277438 del gen de <i>RANKL</i>	
3. 5. SNP 393 T/C del gen de <i>GNAS1</i>	
3. 6. SNP rs219780 del gen de <i>CLDN14</i>	
3. 7. Análisis complementarios	
VI. DISCUSIÓN	pag 149
VII. CONCLUSIONES	pag 161
VIII. BIBLIOGRAFÍA	pag 164
IX. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO	pag 193
X. ANEXOS	pag 196

# i. Listado de abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Akt/PKB: proteín quinasa serina/treonina
- AMP: monofosfato de adenosina
- Ala: alanina
- ANCOVA: análisis de la covarianza
- Arg: arginina
- ARN: ácido ribonucleico
- mRNA: ácido ribonucleico mensajero
- Asp: asparagina
- ATP: trifosfato de adenosina
- BMP-2: proteína morfogénica ósea-2
- Ca/Cr: cociente calcio/creatinina



- Cad Tot: cadera total
- CaR: receptores del calcio
- C Fem: cuello femoral
- CL: columna lumbar
- Cm: centímetro
- CLDN: claudina
- COL1A1: colágeno tipo 1 $\alpha$ 1
- CTX: telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo 1
- DBP: proteína de unión de la Vitamina D
- DE: desviación estándar
- dL: decilitro
- DMO: densidad mineral ósea
- DXA: densitometría ósea por absorciometría de Rayos X de doble energía
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- EEUU: Estados Unidos de América
- ELISA: inmuno ensayo específico
- ESR: gen del receptor de estrógenos
- FA: fosfatasa alcalina
- FAo: fosfatasa alcalina ósea
- bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico
- FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23
- g: gramo
- GDP: difosfato de guanosina
- GH: hormona de crecimiento
- Gly: glicina

- GNAS: gen que codifica la subunidad alfa del receptor de la PTH
- GTP: trifosfato de guanosina
- GWA: estudios de amplia asociación del genoma
- HHF: hipercalcemia hipocalciúrica familiar
- His: histidina
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión
- HPP: hiperparatiroidismo primario
- IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
- IL: interleucinas
- IMC: índice de masa corporal
- IRMA: métodos inmunoradiométricos
- JNK: quinasas c-Jun N terminal
- L: litro
- LRP5: proteína relacionada con la lipoproteína de baja densidad 5
- Lys: lisina
- M-CSF: factor de crecimiento estimulantes de colonias de macrófagos
- MDRD: Estudio de la modificación de la dieta en la enfermedad renal
- µg: microgramo
- µL: microlitro
- mg: miligramo
- min: minuto
- mL: mililitro
- MMC: complejo mayor de histocompatibilidad
- mM: miliMol
- NEM: neoplasia endocrina múltiple

- NF $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B
- ng: nanogramo
- nm: nanómetro
- nM: nanoMol
- 4-NNP: 4-nitrofenil fosfato
- NTX: telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPG: osteoprotegerina
- pg: picogramo
- PCR: proteína C reactiva
- PET: tomografía de emisión de positrones
- PGE-2: prostaglandina E2
- P1CP: propéptido carboxi-terminal del procolágeno 1
- P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1
- pM: picoMol
- PPAR- $\gamma$ : receptor proliferador-activado de peroxisomas
- PTH: hormona paratiroidea
- PTHi: hormona paratiroidea intacta
- PTHrp: proteína relacionada con la hormona paratiroidea
- PTH2R: receptor de la PTH-2
- Rad 1/3: tercio distal del radio
- RANK: receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B
- RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B
- RIA: radioinmunoensayo
- RMN: resonancia magnética nuclear

- RR: riesgo relativo
- SHP: pseudohipoparatiroidismo
- SNP: polimorfismo de un solo nucleótido
- Sost: esclerostina
- SPECT: imagen por emisión de positrones
- TAS: presión arterial sistólica
- TAD: presión arterial diastólica
- TC: tomografía computerizada
- Tc99: Tecnecio 99
- TGF- $\beta$ 1: factor de transformación de crecimiento beta 1
- THS: terapia hormonal sustitutiva
- TNF: factor de necrosis tumoral
- TRAP: fosfatasa ácida resistente al tartrato
- U: unidades
- UI: unidades internacionales
- USA: Estados Unidos de América
- Val: valina
- VDR: receptor de la vitamina D
- VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
- VIP: péptido intestinal vasoactivo

## ii. Introducción

## 1. ESTRUCTURA, REGULACIÓN Y REMODELACIÓN DEL HUESO

### 1. 1. Estructura y desarrollo del hueso

El hueso es un tejido conectivo que consiste en una matriz extracelular mineralizada y células (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos). El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I (90 %). El 10 % restante lo componen otras proteínas no estructurales de menor tamaño: osteocalcina, osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por cristales de un mineral, la hidroxiapatita. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia. El calcio y el fósforo son los principales constituyentes del hueso y juntos representan el 65 % de su peso (Bringhurst *et al* 2009).

Las superficies óseas quiescentes están recubiertas por una capa simple de osteoblastos en reposo que a menudo se denominan “células de revestimiento”. Los osteoblastosNB son células formadoras de hueso que trabajan en grupos para segregar y mineralizar “paquetes” de matriz ósea. Los osteoblastos derivan de progenitores mesenquimales presentes en la médula ósea, los cuales son capaces de diferenciarse hacia otras estirpes celulares, como los adipocitos y los fibroblastos (Arnett 2004). Dentro del linaje osteoblástico, las células osteoprogenitoras se dividen y convierten en células pre-osteoblásticas del estroma (que pueden dividirse más adelante) y por último pueden diferenciarse en osteoblastos. Los osteoblastos ya no se dividen, son de forma cuboide y se

encuentran en la superficie del hueso nuevo. Durante la formación ósea algunos osteoblastos quedan englobados en la matriz que se va depositando a su alrededor y se diferencian a osteocitos formando una red de células dispersas interconectadas. Se piensa que los osteocitos intervienen en la respuesta del hueso a los estímulos mecánicos, actuando como mecano-receptores que se comunican con los osteoblastos y osteoclastos presentes en las superficies óseas. No todos los preosteoblastos y los osteoblastos maduran, un número variable muere por muerte celular programada (Bringham *et al* 2009). Los osteoblastos y sus precursores expresan receptores para muchas hormonas incluyendo la parathormona (PTH), la 1,25(OH)<sub>2</sub>D, las hormonas sexuales y los glucocorticoides y sintetizan una amplia variedad de factores de crecimiento y citocinas al tiempo que son influidos por ellos (Arnett 2004).

Los osteoclastos son las células encargadas de la destrucción del hueso. Son células grandes, móviles, multinucleadas que reabsorben las superficies óseas formando unas lagunas y surcos de bordes festoneados. Los osteoclastos derivan de la fusión de precursores mononucleares de la serie promonocítica, presentes en la médula y en la sangre circulante. Una vez adheridos a la superficie del hueso crean un microambiente al que segregan hidrogeniones que disuelven la fase mineral de la matriz y enzimas proteolíticas que degradan el colágeno. En el polo próximo a la superficie ósea la membrana celular de los osteoclastos forma una serie de pliegues (“borde en cepillo”) que aumentan la superficie activa para la secreción. Los osteoclastos maduros expresan receptores para calcitonina y prostaglandinas.

La formación de los huesos largos tiene lugar a partir de las células mesenquimales de los esbozos embrionarios de las extremidades que se diferencian y forman un cartilago avascular embrionario. Estos rudimentos son después invadidos por vasos sanguíneos y aparecen osteoblastos que comienzan a depositar hueso. Los huesos planos de la mandíbula y el cráneo se forman directamente por la diferenciación del mesénquima embrionario hacia

la línea osteoblástica, sin aparición intermedia de cartílago. Otros huesos se forman por una combinación de ambos procesos de osificación. El hueso que se forma rápidamente durante el crecimiento, o en los lugares de reparación de las fracturas, está constituido por fibras de colágeno de orientación errática, una matriz rápidamente mineralizada y osteocitos distribuidos irregularmente. Éste es el llamado hueso fibroso, un tejido temporal que después se reabsorbe rápidamente y es sustituido por hueso laminar. El hueso laminar está formado por capas dispuestas concéntricamente, en cada una de las cuales las fibrillas de colágeno se alinean de manera uniforme, lo que le confiere resistencia a la fractura.

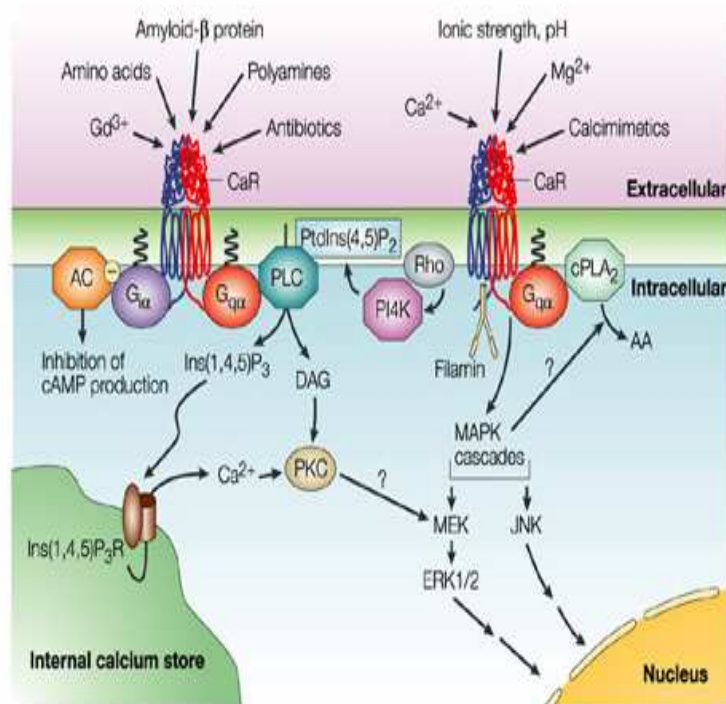
La velocidad máxima de crecimiento lineal de un feto se produce sobre la semana 18 de gestación siendo 4 veces superior a la que tendrá en cualquier periodo postnatal (Veldhuis *et al* 2005). El esqueleto de un neonato contiene aproximadamente 30 g de calcio. La mayor parte de la calcificación intra-útero sucede durante el tercer trimestre. En el primer año de vida el contenido de calcio corporal se triplica. (Veldhuis *et al* 2005). Durante la pubertad se produce un crecimiento esquelético muy llamativo. En las mujeres, aproximadamente el 90 % del contenido mineral total corporal se consigue sobre los 17 años llegando al 99 % a los 27 años. Los distintos tipos de hueso adquieren el pico de masa ósea en edades diferentes, la cadera lo alcanza aproximadamente a los 16-18 años mientras que las vértebras precisan varios años más. Existen datos sobre fracturas en antebrazo distal en niños que sugieren que la baja masa ósea puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de las mismas (Abrams 2003).



## 1. 2. Homeostasis del calcio

El esqueleto es el mayor reservorio de calcio, contiene más del 99 % del calcio total del organismo, casi todo el fósforo y más de la mitad del magnesio corporal. La importancia de los iones minerales para la fisiología celular normal, así como para la integridad ósea, se refleja en los poderosos mecanismos de control endocrinos que han evolucionado para mantener sus concentraciones extracelulares dentro de límites estrechos, p. ej. calcio (8,1 y 10,5 mg/dl) (Bringhurst *et al* 2009). El calcio dentro de este reservorio se encuentra rápidamente disponible ya que hipo e hipercalcemia son entidades que suponen un riesgo para la vida. Hay tres hormonas calciotrópicas principales (PTH, calcitonina y vitamina D) que actúan sobre 3 órganos diana (hueso, riñón e intestino) para conseguir mantener los niveles de calcio en el rango adecuado. Pequeños cambios (1-2 % de descenso) en la concentración extracelular de calcio resultan en un rápido incremento en la secreción de PTH y restauración de los niveles normales de calcio extracelular (Taniegra 2004). En la membrana plasmática de múltiples tejidos relacionados con la homeostasis del calcio (hueso, riñón, intestino...) y también de otros tejidos (neuronas, páncreas, mama, hipófisis y placenta) existe un receptor-sensor del calcio extracelular cuya estructura es la de un receptor acoplado a proteínas G. Los cambios en el calcio extracelular se traducen en respuestas celulares como por ejemplo la activación de fosfolipasas, la inhibición de la formación de AMP (adenosín monofosfato) cíclico y movilización intracelular de calcio. El  $\text{Ca}^{2+}$  se almacena en el interior de las células en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y en el núcleo. Estos sitios de almacenaje proporcionan  $\text{Ca}^{2+}$  a las células incluso en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Figura 1).

Figura 1. Vías de señalización del receptor sensible al calcio



Varios agonistas convergen en el receptor-sensor del calcio extracelular (CaR) para activar un complejo sistema de cascadas de señales de transducción intracelular. AA: ácido araquidónico. AC: adenilato ciclasa. AMPc: Adenosín monofosfato cíclico, cPLA<sub>2</sub>: fosfolipasa citosólica A<sub>2</sub>. DAG: diacilglicerol. ERK: cinasa regulada por señal extracelular, G<sub>1α</sub> y G<sub>qα</sub>: subunidades de las de las proteínas heterotrímicas G de tipo I y Q respectivamente. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>R: receptor del inositol 1, 4, 5-trifosfatasa. JNK: cinasa aminoterminal Jun. MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos. MEK MAPK cinasa. PI4K: fosfatidilinositol 4-cinasa. PKC: proteína cinasa C. PLC: fosfolipasa C. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4-5bifosfato. (Hofer *et al* 2003).

El significado fisiológico de los CaR se ha demostrado ampliamente por ejemplo en enfermedades humanas en las que los CaR se haya mutado o no expresado. Las mutaciones activadoras o inactivadoras de este sensor de calcio hacen que la curva de respuesta a los niveles de Ca<sup>2+</sup> se traslade a la izquierda o a la derecha. Las mutaciones inactivadoras de un alelo del gen de los CaR pueden dar lugar a la hipercalcemia hipocalciúrica familiar en que existen niveles elevados de calcio y secreción aumentada de PTH a pesar de la

hipercalcemia indicando un fallo en la detección de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si existe mutación inactivadora en ambos alelos del gen de los CaR, las células paratiroides son extremadamente resistentes a los efectos supresores de los elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  séricos y se produce el hiperparatiroidismo severo neonatal con hipercalcemia grave e hiperplasia paratiroidea. Esta hiperplasia sugiere que los CaR tienen un papel en la regulación del crecimiento paratiroideo. Las mutaciones activadoras que producen hipersensibilidad a los niveles de calcio producen la hipocalcemia autosómica dominante (Brown *et al* 1998, Chang *et al* 2004),

Los restantes principales elementos que intervienen en la homeostasis del calcio serán comentados en la siguiente sección: PTH, la Vitamina D y la calcitonina.

### 1. 2. 1. Calcio

El 99 % del total del calcio corporal se encuentra en el hueso del que un 99 % se encuentra cristalizado en la fase mineral. El 1 % restante puede intercambiarse rápidamente con el calcio extracelular. Este calcio se distribuye equitativamente entre los líquidos intra y extracelular. El calcio extracelular es el principal sustrato para la mineralización del cartílago y el hueso y sirve como cofactor para una gran cantidad de enzimas extracelulares, principalmente las de la cascada de la coagulación, y como fuente de iones de calcio para una gran diversidad de procesos: automaticidad del nervio y el músculo cardíaco y esquelético y varios procesos de secreción endocrina y exocrina.

Aproximadamente un 50 % del calcio total plasmático está unido a proteínas, principalmente albúmina y globulinas. La concentración de calcio ionizado en suero es de

aproximadamente 5 mg/dl o 1,2 mM y ésta es la fracción biológicamente activa que está controlada por mecanismos hormonales. (Bringhurst *et al* 2009).

### 1. 2. 2. Fósforo

El 85 % del fósforo corporal se encuentra en la fase mineral del hueso, y el resto en forma inorgánica u orgánica en los compartimientos extra e intracelulares. En el suero humano, el fósforo inorgánico está presente en su mayor parte en una forma ionizada como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  o  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Solamente el 12 % del fósforo sérico está unido a proteínas. El fósforo es un constituyente integral de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, complejos de hidratos de carbono, intermediarios glucolíticos, fosfoproteínas estructurales, señalizadoras y enzimáticas y los cofactores nucleótidos de las enzimas y proteínas G. Son particularmente importantes las uniones éster de fosfato de alta energía presentes en las moléculas como el trifosfato de adenosina (ATP) que almacenan energía química (Bringhurst *et al* 2009).

### 1. 3. Remodelación del hueso adulto

Durante la tercera década de la vida, los huesos ya no crecen en longitud pero algunos tipos de hueso muestran un pequeño incremento en su masa ósea. Durante la vida adulta, el esqueleto experimenta un proceso continuo de reparación y renovación. Esta remodelación del hueso se lleva a cabo en las superficies del mismo. El recambio del hueso trabecular puede ser hasta 10 veces más rápido que el del hueso cortical dado que la

superficie expuesta del primero es mucho mayor. La matriz mineralizada es reabsorbida por los osteoclastos y después sustituida por capas concéntricas o laminillas de hueso nuevo formadas por la acción de los osteoblastos. Esta secuencia de fenómenos está estrechamente coordinada. En individuos jóvenes la remodelación mantiene la masa esquelética total prácticamente invariable. Sin embargo, con el envejecimiento, la menopausia o algunas enfermedades se altera el balance de manera que la resorción predomina sobre la formación y se produce una pérdida neta de hueso que conduce a la osteoporosis. El hueso trabecular, como el de los cuerpos vertebrales, es especialmente sensible a las alteraciones del balance óseo dado su rápido recambio (aproximadamente un 25 % es renovado cada año) (Arnett 2004).

#### **1. 4. Regulación hormonal de la remodelación ósea**

El proceso de remodelación y los factores que intervienen en ésta varían de acuerdo con el sitio donde se esté llevando a cabo. Las células remodeladoras en el hueso trabecular están en íntimo contacto con células presentes en la médula ósea que producen múltiples factores paracrinos. La conducta de las células en el hueso cortical, más distantes de la producción de estos factores, parece ser modulada más acusadamente por factores endocrinos como la vitamina D y la PTH.

### 1. 4. 1. Regulación paracrina

Existen numerosos factores que modulan el metabolismo óseo a nivel local como pueden ser el sistema OPG/RANK/RANKL o la vía Wnt.

El papel del sistema OPG/RANKL en patología humana es un tema de estudio actual. El RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B), perteneciente a la superfamilia de ligandos del TNF fue descubierto en 1998 (Lacey *et al* 1998, Yasuda *et al* 1998, Wong *et al* 1998) y su gen se localiza en 13q14. La disponibilidad de métodos para cuantificar la OPG y RANKL en sangre ha permitido la obtención de los primeros datos pero no está claro que informen de lo que ocurre a nivel local en el hueso. La determinación de RANKL soluble en sangre no parece útil en la mayoría de las enfermedades metabólicas del hueso, mientras que los datos con niveles séricos de OPG sí parecen ser más indicativos de lo que ocurre en el hueso.

El RANKL existe en dos formas, una unida a la membrana de los osteoblastos (de la que existe a su vez una forma íntegra de 317 aminoácidos y otra truncada por rotura enzimática en las posiciones 140-145) y otra soluble, excretada por la célula al espacio extracelular. Diversas células esqueléticas y extraesqueléticas son capaces de expresar el RANKL (células del estroma, osteoblastos, osteoclastos, células del mesenquima perióstico, condrocitos, células endoteliales, células T activadas y diversas células cancerosas), si bien no todas ellas producen RANKL soluble. Su producción varía dependiendo del grado de madurez y diferenciación de las células. La producción es máxima por las células indiferenciadas del estroma y va disminuyendo según madura el fenotipo osteoblástico (Gutiérrez 2004). El RANKL en presencia de M-CSF es necesario y suficiente para promover la diferenciación de las células de la estirpe monocitaria/macrofágica hacia osteoclastos. El RANKL también estimula la activación de los osteoclastos, su supervivencia y su adherencia

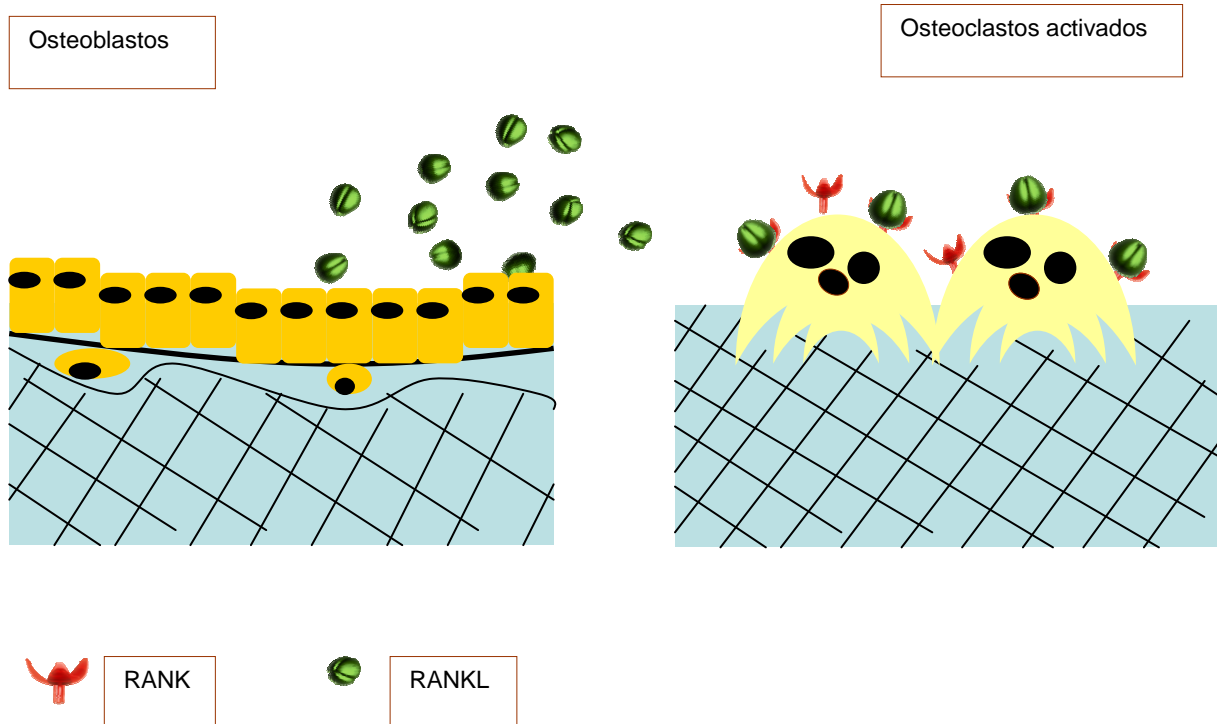
a las superficies óseas. La administración de RANKL a ratones activa los osteoclastos, y produce osteoporosis e hipercalcemia graves. Por el contrario los ratones *knock-out* para RANKL tienen osteopetrosis.

Los efectos del RANKL son mediados por RANK, un receptor de membrana altamente específico, expresado por osteoclastos, células B y T y cuyo gen está localizado en 18q21. Una vez unido a su receptor, el RANKL estimula la diferenciación y fusión de células precursoras de osteoclastos, activa los osteoclastos maduros y prolonga su vida al inhibir la apoptosis. Junto al M-CSF, esta proteína es la señal más poderosa en la inducción de la cascada de eventos intracelulares involucrados en la osteoclastogénesis. El contacto célula-célula entre osteoblastos y osteoclastos permite que el RANKL se una al RANK y desencadene estos eventos. El osteoblasto puede regular la actividad osteoclástica variando el equilibrio entre RANKL y la OPG (Mosekilde *et al* 2008). Así, el sistema RANK/RANKL es crucial para la inducción de la formación y activación osteoclásticas, siempre y cuando haya cantidades suficientes de M-CSF en el microambiente óseo (Yasuda *et al* 1999). El RANK (Receptor activador del factor NF- $\kappa$ B) media los efectos del RANKL, a través de una cascada de proteínas (NF- $\kappa$ B, JNK, c-fos/c-jun, c-src, Akt/PKB) que regulan la activación, la diferenciación, la apoptosis y el citoesqueleto de los osteoclastos (Li *et al* 2001). Los ratones *Knock-out* para el factor NF- $\kappa$ B carecen de osteoclastos. (Figura 2).

Además del RANK, existe otro receptor soluble (receptor "señuelo" que se une al RANKL impidiendo su unión al receptor RANK) segregado por los osteoblastos y muchas otras células, denominada osteoprotegerina (OPG), que fue identificada en 1998 (Morinaga *et al* 1998) y cuyo gen está situado en 8q24.

La OPG se interpone entre RANK y RANKL y por tanto, los efectos de la OPG son

**Figura 2. Simulación de la producción de RANKL y su interacción con RANK**



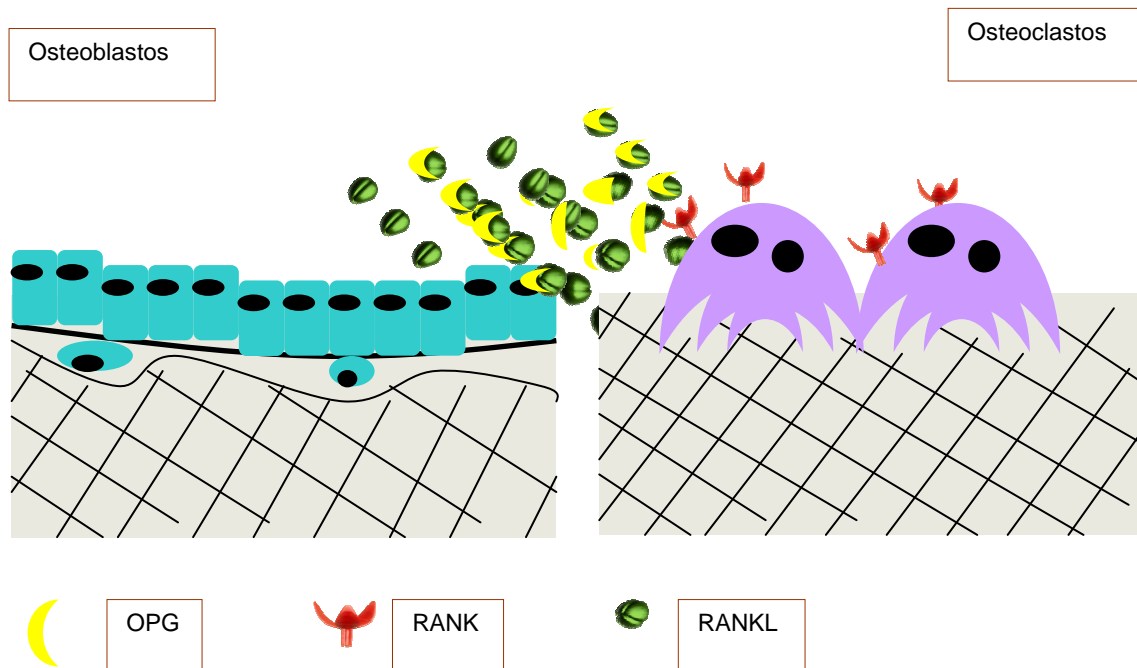
los contrarios a los del RANKL (inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores osteoclásticos, suprime la actividad osteoclástica y promueve la apoptosis de los osteoclastos). La expresión diferencial de estas proteínas parece desempeñar un papel preponderante en la regulación de la remodelación ósea. La mayoría de los factores que modulan el RANKL afectan inversamente a la síntesis de OPG. Los ratones transgénicos que sobreexpresan OPG o los ratones que reciben OPG exógena presentan osteopetrosis. Los ratones *knock-out* para OPG presentan osteoporosis grave. Los ratones sin OPG presentan además calcificaciones vasculares y formación de aneurismas, que pueden prevenirse mediante la hiperexpresión transgénica de OPG. La ausencia de OPG en humanos produce un tipo de hiperfosfatemia-enfermedad de Paget juvenil (Cundy *et al* 2002).

Experimentalmente, la OPG ha sido capaz de bloquear la destrucción ósea y revertir la hipercalcemia asociada a metástasis de cáncer mamario. En humanos, los niveles séricos



de OPG tienden a aumentar con la edad y en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis o fracturas, sugiriendo un papel potencialmente protector en estas situaciones de resorción ósea aumentada o acelerada (Yasuda *et al* 1999, Browner *et al* 2001, Jorgensen *et al* 2004, Mezquita-Raya *et al* 2005, Oh *et al* 2005). Browner en 2001 observó niveles elevados de OPG sérica en mujeres con diabetes y en mujeres que fallecieron posteriormente por enfermedades cardiovasculares. Khosla *et al* en 2002 describió este aumento de los niveles séricos de OPG en mujeres y hombres mayores de 50 años y observó su correlación negativa con los niveles de testosterona total y libre y estradiol libre en varones y con la DMO (densidad mineral ósea) de radio en varones y también una correlación positiva con los marcadores de remodelación ósea en varones. Vik *et al* en 2010 observaron que los niveles séricos de OPG predecían el crecimiento de la placa aterosclerótica en la carótida únicamente en mujeres, pero no de la formación de dicha placa (Vik *et al* 2010).

**Figura 3. Simulación de la producción de OPG y su interacción con RANKL**



La regulación de los genes del RANKL y de la OPG, generalmente antagónica, está modulada por muchos mediadores, entre los que se encuentran los glucocorticoides, el calcitriol, el estradiol, la PTH, el VIP, el TGF- $\alpha$ , la BMP-2 y BMP-7, el FGF-2, la activina A, la IL-1 $\beta$ , la IL-6, la IL-11, el TNF $\alpha$  y  $\beta$ , la PGE2, el PPAR-Y, el ácido ascórbico y otros factores de transcripción de células mesenquimales (Suda *et al* 2000, Hofbauer *et al* 2000). Así el calcio, el calcitriol, la dexametasona, las interleucinas 1, 6 y 11 y la PTH aumentan la producción de RANKL *in vitro*, mientras que la dexametasona, el calcitriol y la PTH disminuyen la de OPG. Los niveles séricos de IL-6 han demostrado tener capacidad para predecir la pérdida y resorción óseas en sujetos adultos y en menor grado también la PCR y el TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que una terapia “específicamente” antiinflamatoria podría ser útil en la prevención de la osteoporosis (Ding *et al* 2008). En experimentos en ratones tras tratamiento continuo con PTH se demuestra un aumento del mRNA del RANKL y del índice RANKL/OPG asociado a un aumento en el número de osteoclastos siendo este efecto dosis dependiente. Estos efectos pueden revertirse añadiendo OPG y no se observan si la administración de PTH no es continua. (Locklin *et al* 2003). Estos datos apoyan el hecho de que la osteoclastogénesis que induce la PTH está mediada por los cambios en la expresión de RANKL y OPG en las células osteoblásticas (Huang *et al* 2004). La OPG tiene un ritmo circadiano con un máximo vespertino y un mínimo matutino que precede en la dirección opuesta al ritmo circadiano de la PTH (Joseph *et al* 2007).

En humanos con hiperparatiroidismo primario (HPP) leve los niveles en sangre de RANKL se encuentran elevados y correlacionan con marcadores de remodelación ósea (NTX sérico y pyrilinks D urinarios). Los niveles de OPG sérica se mantienen dentro del rango considerado normal y no parecen correlacionar con dichos marcadores de remodelación ósea (Nakchbandi *et al* 2008). Además, los niveles de RANKL sérico correlacionan positivamente con las tasas de pérdida ósea en el fémur total en los sujetos con HPP explicando por sí

solos un 27 % de dicha pérdida. La elevación combinada de IL-6, de su receptor soluble y del RANKL sérico identifican un grupo con una tasa de pérdida ósea muy elevada en el fémur total en comparación con el grupo total de HPP estudiados a pesar de tener unos niveles de PTH similares. Estos datos sugieren que la pérdida ósea en el HPP puede predecirse mejor mediante los niveles de las citocinas séricas que por los de PTH, especialmente en mujeres (Nakchbandi *et al* 2008), aunque aún se necesitan más estudios que confirmen estos datos preliminares.

Como ya hemos dicho, existe otra vía de señalización local a nivel del hueso llamada Wnt/ $\beta$ -Catenina cuya vía canónica es fundamental en el control de varias funciones celulares. Los osteoblastos son el objetivo principal de sus efectos en el hueso. La  $\beta$ -Catenina es esencial para definir si los progenitores mesenquimales se diferencian a osteoblastos o a condrocitos y también interviene en la proliferación, apoptosis y función de los osteoblastos. Wnt regula la expresión de OPG pues los osteoblastos con deficiencia en  $\beta$ -Catenina tienen una expresión elevada de RANKL y disminuida de OPG. A través de este fenómeno la vía Wnt regula también, aunque indirectamente, la diferenciación de los osteoclastos (Baron *et al* 2007).

## **1. 4. 2. Regulación endocrina**

### **1. 4. 2. 1. PTH**

#### **1. 4. 2. 1 .1. Síntesis y secreción de la PTH**

La PTH es una proteína de 84 aminoácidos que se sintetiza como un precursor mayor, la pre-pro-parathormona. Después de la división de la secuencia pro, la PTH (1-84) madura se concentra en las vesículas y gránulos secretores. Un subtipo de estos gránulos

contiene PTH y proteasas lo que probablemente explica que una porción de la PTH segregada consista en fragmentos carboxi-terminales. No se segregan fragmentos amino-terminales. Los fragmentos carboxi-terminales no activan el receptor PTH/PTHrP por lo que la degradación de la PTH sintetizada de novo dentro de estos gránulos probablemente representa una vía inactivada que proporciona un mecanismo de regulación importante. Bajo condiciones de hipercalcemia, la secreción de PTH disminuye sustancialmente y la mayoría de lo segregado consiste en fragmentos carboxi-terminales (Bringham *et al* 2009).

La mayoría de las células del organismo mantienen un constante y muy bajo nivel de calcio intracelular a pesar de las fluctuaciones en el calcio extracelular. La célula paratiroidea es excepcional pues cambios moderados en el calcio extracelular conducen a cambios correspondientes en el calcio intracelular pues cuando el calcio activa la superficie celular del receptor sensible al calcio, aumenta su concentración intracelular por liberación de calcio de los depósitos intracelulares lo que conduce a una disminución en la secreción de PTH. El receptor sensible al calcio de las glándulas paratiroides es un miembro de la familia de receptores ligados a la proteína G.

La glándula paratiroides regula a intervalos más prolongados la expresión del gen de la PTH. La forma activa de la vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  no tiene un efecto directo en la secreción de PTH pero suprime de forma importante la transcripción del gen de la PTH. La hipocalcemia aguda conduce al aumento en el ARN mensajero de la PTH y a la inversa.

Las glándulas paratiroides son normalmente 4 y están localizadas detrás de los cuatro polos de la glándula tiroides aunque pueden existir glándulas ectópicas en varias localizaciones: intratiroidea, mediastínica, retroesofágicas... La PTH regula la concentración extracelular de calcio dentro de un estrecho rango de normalidad y su respuesta se puede producir en segundos. Las células de las glándulas paratiroides tienen tres propiedades fundamentales (Taniegra 2004):

- I. Sintetizan, procesan y almacenan grandes cantidades de PTH de una manera regulada
- II. Segregan rápidamente la hormona almacenada en respuesta a los cambios en el calcio sanguíneo
- III. Se replican cuando reciben estímulos crónicos. Se replican poco en la edad adulta pero el número de células aumenta espectacularmente cuando existe hipocalcemia, niveles bajos de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ , de hiperfosfatemia o uremia y durante el crecimiento neoplásico. Es una respuesta lenta y no fácilmente reversible, cuando desaparece la necesidad de este aumento de células paratiroides el hiperparatiroidismo persistente puede causar alteraciones clínicas importantes durante meses y años (Bringhurst *et al* 2009)

El principal regulador de la secreción de PTH es la concentración de calcio sérico ionizado en sangre. Las concentraciones bajas de calcio estimulan la secreción de PTH y las concentraciones elevadas de calcio disminuyen su secreción. La PTH se une a los receptores de la superficie celular en el hueso y el riñón, desencadenando respuestas que aumentan el calcio sanguíneo (Bringhurst *et al* 2009).

#### **1. 4. 2. 1. 2. Receptor de la PTH y PTHrp (proteína relacionada con la PTH)**

Es un miembro de la familia de receptores ligados a las proteínas G y media la acción de PTH y PTHrp. Se expresa marcadamente en el riñón y en osteoblastos del hueso pero también en una gran variedad de tejidos como el músculo liso, cerebro. El gen *GNAS1* localizado en 20q13.3 codifica la subunidad  $G_s\alpha$  de este receptor. Esta familia de receptores actúa como intercambiador de nucleótidos. La unión de la PTH al receptor PTH/PTHrp conduce al intercambio del trifosfato de guanosina (GTP) para que el difosfato de guanosina

(GDP) se une a las subunidades  $G\alpha$  que unidas al GTP se liberan del receptor y de las subunidades  $\beta\gamma$  y activan los efectores. La  $G_s\alpha$  activa la adenilato ciclasa conduciendo a la formación de AMP cíclico que activa la lipasa A. Receptores con determinadas mutaciones puntuales activan la  $G_s$  aún sin estimulación hormonal. La activación continua inapropiada del receptor PTH/PTHrP observada en la condrodistrofia de Jansen conduce a todas las anormalidades metabólicas encontradas en el HPP lo que resulta ser una evidencia de que el receptor PTH/PTHrP media *in vivo* las acciones de la PTH en hueso y riñón. Una mutación en  $G_s\alpha$  junto con resistencia a la PTH es lo que caracteriza al pseudohipoparatiroidismo (SHP) la y pseudo-SHP. Se han descrito varios pacientes con SHP lb que presentan cambios óseos consistentes con hiperparatiroidismo. La PTH actúa sobre este receptor en precursores de los osteoblastos para aumentar la producción del factor estimulante de las colonias de osteoblastos (M-CSF) y del RANKL y para disminuir la producción de OPG. El M-CSF y el RANKL estimulan la producción y actividad de osteoclastos.

Los pacientes con SHP tienen una DMO menor que las personas normales y que los pacientes hipoparatiroides aunque ya que los marcadores de remodelación ósea en los pacientes con SHP no son tan elevados como en los HPP se ha postulado que la resistencia a la PTH en el hueso de estos pacientes es relativa. Existe otro síndrome con afectación ósea en el que el defecto molecular es el mosaicismo somático de una mutación activadora de la subunidad  $G_s\alpha$ , es el síndrome de McCune-Albright en el que entre otras manifestaciones endocrinológicas y cutáneas aparecen lesiones expansivas en el hueso que contiene fibroblastos y osteoblastos diagnosticándose como lesiones óseas que causan fracturas o deformidades (Bringham *et al* 2009). Las mutaciones en el gen que codifica este receptor si son inactivadoras causan hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF) y las mutaciones activadoras causan hipoparatiroidismo familiar con hipercalciuria (Bringham *et*

al 2009). Es poco probable que todas las acciones de la PTH se expliquen por las interacciones con el receptor PTH/PTHrp. Se ha clonado un segundo receptor de PTH que se activa por la PTH pero no por la PTHrp, llamado receptor PTH2 (PTH2R) y que se expresa en múltiples tejidos pero no en osteoblastos o túbulos renales aunque se desconoce su papel funcional (Bringhurst *et al* 2009).

#### **1. 4. 2. 1. 3. Metabolismo de la PTH**

La PTH se metaboliza en el hígado (70 %) y en el riñón (20 %) y desaparece de la circulación con una vida media de 2-5 minutos. Este rápido metabolismo no se ve afectado por los niveles de calcio sanguíneo o de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ . Este tipo de metabolismo asegura que los niveles de PTH estén determinados principalmente por la actividad de las glándulas paratiroides (Bringhurst *et al* 2009).

#### **1. 4. 2. 1. 4. Acción de la PTH en el riñón**

a) Estimulación de la reabsorción de calcio. Prácticamente todo el calcio en el primer filtrado glomerular se reabsorbe por los túbulos renales. El 65 % se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal a través de un transporte pasivo. La PTH afecta poco al flujo de calcio en esta región, el resto se reabsorbe más distalmente. La nefrona distal es el lugar donde ocurre principalmente la absorción renal de calcio y normalmente reabsorbe casi todo el calcio restante filtrado por medio de un mecanismo de transporte activo transcelular. El calcio entra en la célula tubular distal desde el lumen tubular a través de unos canales con voltaje sensibles al calcio; la PTH regula esta conductancia y los diuréticos tiazídicos ejercen un efecto similar. En estas situaciones, aunque la tasa de reabsorción tubular distal de calcio está elevada por la PTH la cantidad total de calcio en la orina final probablemente sea alta por la elevada filtración inicial (Bringhurst *et al* 2009).

b) Inhibición del transporte de fósforo. La reabsorción de fósforo ocurre principalmente en el túbulo proximal que absorbe aproximadamente el 80 % de la filtración renal. El fósforo adicional se reabsorbe en el túbulo distal dejando alrededor de un 10-12 % de fosfato a su excreción urinaria. La PTH inhibe la reabsorción de fósforo en los túbulos proximal y distal aunque el efecto proximal es cuantitativamente el más importante.

c) Otros efectos renales. La PTH estimula la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  en el túbulo proximal al inducir rápidamente la transcripción del gen  $1\text{-}\alpha\text{-hidroxilasa}$  de la  $25\text{-OH-D}$ . Este efecto puede anularse por la hipercalcemia o por la acción de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

#### **1. 4. 2. 1. 5. Acción de la PTH en el hueso**

La PTH actúa directa e indirectamente en varios tipos celulares y aumenta la formación y la resorción ósea predominando la resorción. La administración continua de PTH conduce a la liberación de calcio del hueso. Pero este efecto sobre la homeostasis del hueso contradice los efectos variables de la hormona sobre el hueso ya que depende del tipo de hueso (trabecular o cortical) del tipo de célula diana en particular y del patrón de administración de PTH (Bringham *et al* 2009).

Los receptores para la PTH se encuentran en las células preosteoblásticas, osteoblastos y osteocitos. La PTH cambia la población celular osteoblástica al estimular la proliferación celular disminuyendo la apoptosis de los preosteoblastos y osteoblastos y aumentando así el número de osteocitos y, tal vez, convirtiendo la línea celular inactiva en osteoblastos. Cuando se añade a cultivos celulares, la PTH interrumpe la maduración de las células pre-osteoblásticas a osteoblastos maduros. Además, la PTH cambia la actividad de los osteoblastos maduros por una variedad de mecanismos. Cuando la PTH se añade a



osteoblastos aislados in vitro, los osteoblastos disminuyen la síntesis de colágeno I y otras proteínas de la matriz. Sin embargo, el efecto in vivo más obvio de la PTH es aumentar la formación de hueso, probablemente por acciones indirectas como la estimulación de la síntesis del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) y otros factores de crecimiento por las células del linaje osteoblástico. Sorprendentemente, los osteoclastos, células de resorción ósea derivadas de precursores hematopoyéticos, no tienen receptores de PTH. Por el contrario, los preosteoblastos y los osteoblastos señalizan a los precursores de los osteoclastos para que se fusionen entre ellos y formen osteoclastos maduros y a éstos para que reabsorban el hueso y eviten la apoptosis.

También tiene efectos sobre el sistema de citocinas OPG/RANK/RANKL. El RANKL es un componente de membrana de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) cuya síntesis aumenta por acción de la PTH. El RANKL se une a su receptor, RANK, que se encuentra en los precursores de los osteoclastos y en los osteoclastos maduros. La unión de RANKL y RANK se bloquea por la osteoprotegerina (OPG), otro miembro de la familia de receptores de TNF. La OPG circula y se segrega por las células de la línea celular osteoblástica. La PTH disminuye la síntesis y secreción de OPG de estas células. Así, la PTH, al aumentar RANK y disminuir OPG de forma local en el hueso ayuda a aumentar la resorción del hueso. La osteoclastogénesis inducida por PTH parece estar mediada por cambios en la expresión del RANKL y OPG en las células osteoblásticas (Huang *et al* 2004). Recientemente se ha estudiado el ritmo circadiano de los niveles de PTH y OPG y su correlación. Los perfiles de secreción de PTH y OPG mostraron una relación inversa y especular lo que sugiere que la expresión de PTH y OPG puede estar unida por factores reguladores comunes. Estas fluctuaciones diarias en la concentración de PTH pueden regular directa o indirectamente la producción de OPG lo que está en consonancia con los datos conocidos sobre el efecto supresor que ejerce la PTH sobre la producción de OPG. Y por otra

parte, se sabe que el ritmo circadiano de la PTH es un regulador importante de la remodelación ósea y este efecto mediado por un determinado ritmo de secreción de PTH podría ser, al menos en parte, mediado por el ritmo de la OPG (Joseph *et al* 2007).

Debido a que la PTH aumenta la formación y resorción del hueso, el efecto neto de la PTH sobre la masa ósea varía de forma importante de una parte del hueso a otra y también si la PTH se administra continua o intermitentemente. La administración intermitente a dosis bajas de PTH en humanos origina una gran elevación neta de la masa ósea trabecular con poco efecto en el hueso cortical. Por el contrario, la administración continua de PTH conduce a la disminución en la masa ósea cortical, mientras el efecto neto de la PTH sobre el hueso trabecular depende de la dosis. En el hiperparatiroidismo leve hay poco efecto neto de la PTH sobre el hueso trabecular y una disminución en el hueso cortical. En todas estas situaciones, está aumentada la tasa de formación de hueso. El nivel variable de resorción osteoclástica determina el efecto neto de la PTH sobre la masa ósea (Bringhurst *et al* 2009).

#### **1. 4. 2. 2. Vitamina D**

La vitamina D no es una vitamina verdadera pues no se requiere un suplemento nutricional si existe una adecuada exposición solar. Cuando la piel se expone a los rayos ultravioleta, el precursor cutáneo de la vitamina D, el 7-dehidrocolesterol sufre una división fotoquímica y el producto resultante es la pre-vitamina D que puede isomerizarse a dos productos biológicamente inertes lo que previene la producción de cantidades excesivas de vitamina D ante una exposición prolongada al sol. Una fuente alternativa de vitamina D es la dieta. El anciano, el paciente hospitalizado y quienes viven en poblaciones nórdicas probablemente obtienen la mayor parte de la vitamina D de las fuentes dietéticas. La deficiencia de vitamina D es prevalente y contribuye de manera importante a la osteopenia y al riesgo de fracturas. Las principales fuentes de vitamina D son los productos lácteos

enriquecidos, las yemas de los huevos y el aceite de pescado. La vitamina D proporcionada por las plantas se encuentra en forma de vitamina D<sub>2</sub> y la proporcionada por los animales en forma de vitamina D<sub>3</sub> aunque tienen funciones biológicas equivalentes. La vitamina D se absorbe en los vasos linfáticos y entra en la circulación unida principalmente a la proteína transportadora de vitamina D, una  $\alpha$ -globulina (VDR). En el hígado, la vitamina D sufre una 25-hidroxilación por una enzima de tipo citocromo P450 presente en las mitocondrias y los microsomas. La vida media de la 25-OH-D<sub>3</sub> es de aproximadamente 2-3 semanas. La 25-hidroxilación de la vitamina D<sub>3</sub> no está muy regulada por lo que los niveles sanguíneos de 25-OH-D<sub>3</sub> reflejan la cantidad de vitamina D que entra en la circulación. Cuando están disminuidos los niveles de proteína transportadora de Vitamina D, los niveles circulantes de 25-OH-D<sub>3</sub> también se encuentran reducidos. El paso final para la producción de hormona activa es la 1 $\alpha$ -hidroxilación de 25-OH-D<sub>3</sub> a 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. La vida media de esta hormona es de aproximadamente 6 a 8 horas. Al igual que la 25-hidroxilasa, la 1  $\alpha$ -hidroxilasa en el túbulo contorneado proximal es una oxidasa de tipo citocromo P450 pero cuya acción está muy regulada. La PTH y la hipofosfatemia son los principales inductores de esta enzima microsomal, mientras que el calcio y su producto enzimático, la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> lo inhiben. (Bringhurst *et al* 2009).

La 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> ejerce sus funciones biológicas por su unión a un receptor nuclear que regula la transcripción de ADN a ARN. El receptor de la vitamina D se expresa en muchos tejidos y regula la diferenciación celular y la función de muchos tipos celulares. No obstante, el efecto fisiológico más importante de la vitamina D, a través del receptor de la vitamina D, es la regulación del transporte de calcio intestinal. Aproximadamente se absorbe el 30-35 % del calcio ingerido con la dieta. También favorece la absorción intestinal de iones fosfato. Parece que su papel principal en el hueso es proporcionar un microambiente

adecuado para la mineralización del hueso a través de la estimulación de la absorción intestinal de calcio y fosfato (Bringhurst *et al* 2009, Younes *et al* 2005).

#### **1. 4. 2. 3. Calcitonina**

La calcitonina tiene un papel importante en la regulación del calcio sanguíneo en el pez y en los roedores pero su importancia en la homeostasis del calcio humano se desconoce. La calcitonina se produce en la glándula tiroides, en las células no foliculares llamadas células C. El receptor sensible al calcio clonado en las células paratiroideas también se expresa en las células C y contribuye a la regulación de la secreción de calcitonina. Cuando la calcitonina se administra de forma aguda, disminuye la reabsorción tubular de calcio y disminuye la resorción de hueso por los osteoclastos por acción directa sobre los mismos. Sin embargo, se desconoce el papel fisiológico de la calcitonina en humanos (Bringhurst *et al* 2009).

#### **1. 4. 2. 4. Hormonas sexuales**

Las células óseas expresan receptores estrogénicos y androgénicos con independencia de cuál sea el sexo del individuo. Las hormonas sexuales tienden a ejercer un efecto positivo sobre la formación ósea. El efecto más claro de estas hormonas sobre el metabolismo óseo es la inhibición de la resorción pues disminuyen la frecuencia de activación de las unidades de remodelación y favorecen la apoptosis de los osteoclastos. Tanto andrógenos como estrógenos inhiben la producción de citocinas “pro-resortivas” por parte de células del estroma y osteoblastos al tiempo que estimulan la síntesis de osteoprotegerina (Riancho 2004).

#### **1. 4. 2. 5. Hormonas tiroideas**

Las hormonas tiroideas son necesarias para el reclutamiento, la maduración y la actividad de osteoblastos y osteoclastos. Actúan directamente sobre las células óseas, modulan el proceso de remodelación e inducen cambios secundarios en las concentraciones de calcio, PTH y vitamina D (Mezquita 2004).

#### **1. 4. 2. 6. GH e IGF-1**

La hormona de crecimiento (GH) estimula el crecimiento longitudinal óseo en la fase de desarrollo. La mayor parte de sus efectos biológicos son mediados por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I. Su papel en la función de las células de linaje osteoblástico está claramente establecido: estimula la proliferación, diferenciación y mineralización de la matriz y disminuye la degradación del colágeno. El efecto del sistema GH-IGF-I sobre el hueso es anabólico (Mezquita 2004).

#### **1. 4. 2. 7. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides ejercen un efecto deletéreo sobre la masa ósea. Sus acciones sistémicas que predisponen a reducir la masa ósea son:

- disminución de la concentración de esteroides sexuales y adrenales
- disminución de la absorción intestinal de calcio e hipercalciuria
- hiperfosfaturia e incremento en los niveles de PTH
- inhibición de la transcripción de IGF-I

También ejercen acciones directas sobre el hueso que afectan a la fase de formación ósea con aumento de la resorción que se ha demostrado durante el tratamiento con glucocorticoides: menor aposición mineral, reducción del grosor trabecular y disminución de la matriz osteoide. Suprimen también el reclutamiento de osteoblastos con acortamiento de la

vida media y menor capacidad funcional. Producen un incremento en la superficie de erosión.

(Mezquita *et al* 2004).

## 2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL METABOLISMO FOSFO-CÁLCICO

### 2. 1. Determinaciones analíticas generales

#### 2. 1. 1. Calcio total

El método de referencia para la medida de la concentración de calcio en plasma es la espectrometría de absorción atómica pero el más utilizado en los analizadores automáticos es la espectrofotometría de la unión del calcio al complejo  $\theta$ -cresolftaleína a pH alcalino. La muestra preferentemente utilizada es suero en ayunas aunque también puede utilizarse plasma heparinizado. La hemólisis, la ictericia y la lipemia también pueden producir interferencias (Younes *et al* 2005). El intervalo de referencia en suero en adultos está en torno a 8,1-10,4 mg/dL. Los niveles séricos de calcio dependen de la concentración de proteínas por lo que se debe corregir añadiendo 0,8 mg/dL al calcio sérico por cada g/dL que desciende la albúmina por debajo de 4 g/dL. Algunos factores limitan la utilidad de esta fórmula (pH, ácidos grasos, drogas...). Por ello hay situaciones en que es necesario determinar directamente el calcio ionizado. La reproducibilidad intraensayo del método es del 2,7 % y la interensayo, 2,9 % (García-Unzueta 2004).

#### 2. 1. 2. Calcio iónico

Es la forma biológicamente activa del calcio (Younes *et al* 2005). Se mide mediante analizadores con electrodo selectivo para la determinación del ión calcio. La muestra (suero,

sangre total heparinizada o plasma heparinizado) debe ser recogida y manipulada en anaerobiosis a fin de evitar cambios en el pH. No se debe utilizar compresor, o al menos evitar compresiones largas. Además, para evitar cambios en el pH debidos al metabolismo celular, la muestra debe ser procesada inmediatamente o ser centrifugada en tubo con gel separador, donde es estable a 4° C aproximadamente durante una semana. Dado que la concentración del ión calcio se ve fundamentalmente influida por el valor del pH, los analizadores determinan la concentración para el pH real de la muestra y además se pueden calcular para un pH de 7,4. Los valores normales de calcio iónico en suero son 1,16-1,30 mM/L. Las variabilidades intraensayo e interensayo son del 1,2 % y 1,8 % respectivamente (García-Unzueta 2004).

### **2.1.3. Fósforo**

Se determina mediante espectrofotometría automatizada. La más utilizada es la reacción del fósforo inorgánico con el molibdato amónico para formar fosfomolibdato, que se mide a 340 nm. La desventaja de este método es una interferencia en caso de hemólisis, ictericia y lipemia. Se precisa suero o plasma heparinizado. Los anticoagulantes como citrato, oxalato o EDTA, interfieren con la formación del complejo de fosfomolibdeno. La muestra debe ser extraída en ayunas durante la mañana. Los niveles séricos de fosfato tienen variación diurna, siendo más elevados por la tarde y la noche, y se ven influidos por la ingesta y el ejercicio. En suero en adultos, los valores normales se encuentran en torno a 2,3-4 mg/dL. En niños, los valores son más elevados, de 4-7 mg/dL. La hemólisis, el reposo prolongado, la menopausia y el ejercicio intenso elevan los niveles séricos de fosfato. La



reproducibilidad intraensayo e interensayo son del 1,7 y 2,6 % respectivamente (García-Unzueta 2004).

#### **2. 1. 4. Fosfatasa alcalina total**

Se determina mediante espectrofotometría de la actividad de la enzima sobre diferentes sustratos (4-nitrofenil-fosfato-4NPP-, fenoltaleína monofosfato,  $\alpha$ -naftilfosfato, etc.). El más recomendado es el 4-NPP. Hay que tener en cuenta que la actividad plasmática es el resultado de la suma de la actividad de las diferentes isoenzimas procedentes del hígado, hueso, tracto gastrointestinal, riñón, placenta y posibles tejidos tumorales. Las diferentes isoenzimas de la fosfatasa alcalina (FA) se pueden analizar de forma separada mediante varios métodos: análisis electroforético, desnaturalización por calor o urea, inhibición diferencial por sustancias químicas específicas y métodos inmunológicos. Específicamente, la FA ósea puede actualmente determinarse mediante enzimoimmunoensayo. Se precisa suero o plasma heparinizado, preferentemente en ayunas. El ensayo debe realizarse inmediatamente. La hemólisis produce interferencias. Los valores de normalidad dependen de la técnica empleada. A menudo están en torno a 40-129 U/L pero hay que tener en cuenta que varían con el sexo y la edad. Aumentan especialmente en los niños en crecimiento y durante el embarazo y en menor medida tras la menopausia. La actividad de la FA puede verse interferida por diferentes fármacos. Las variabilidades intra e interensayo son del 2 y 3,5 % respectivamente (García-Unzueta 2004).

### 2.1.5. Metabolitos de la vitamina D

Entre todos los metabolitos, las determinaciones de mayor interés clínico son las de la 25-OH-D y 1,25 (OH)<sub>2</sub> D –comprendiendo las isoformas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>-. Es de elección la determinación de 25-OH-vitamina D para valorar la dotación de vitamina D. La determinación de los metabolitos de la vitamina D se puede realizar mediante HPLC (cromatografía líquida de alta presión), radioinmunoensayo (RIA), ELISA o ensayo de fijación competitiva a proteínas, utilizando como fijador DBP (proteína fijadora de vitamina D). A menudo se precisa una fase previa de extracción y pre-purificación, que separa los metabolitos de la proteína transportadora y los purifica en parte. La muestra recomendada es el suero. También puede utilizarse plasma-EDTA en los ensayos con extracción cromatográfica previa. La muestra en EDTA debe conservarse en hielo hasta la separación del plasma. El intervalo de referencia se suele fijar en unos 25-60 ng/mL. Sin embargo, hay que tener presente que los niveles séricos se relacionan directamente con la exposición al sol, de tal manera que están más elevados al final de verano y disminuyen en invierno y primavera. Los niveles también dependen de la latitud, protección solar utilizada, pigmentación de la piel y dieta. Muchos autores opinan que los valores “saludables” están por encima de 20-25 ng/mL. Los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> D varían escasamente a lo largo del año; están en torno a 18-55 pg/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo son elevados, en torno al 9-14 % respectivamente (García-Unzueta 2004).

## 2. 1. 6. PTH

La PTH inmunorreactiva circulante existe como una mezcla de la hormona intacta (PTH 1-84) y de fragmentos hormonales de menor masa molecular: los fragmentos amino terminales (1-34), en los que reside la actividad biológica, y los fragmentos carboxiterminales (53-84), que son inactivos. La hormona intacta (PTHi) y los fragmentos N-terminales tienen vida media corta (5 minutos); sin embargo, el fragmento C-terminal tiene mayor vida media habitualmente en torno a 30 minutos pero se incrementa mucho cuando existe insuficiencia renal. En la actualidad, los inmunoensayos automatizados de doble anticuerpo (fundamentalmente quimioluminiscencia) son los más utilizados para determinar la PTHi (PTH 1-84). La medida de los fragmentos C-terminales tiene mucha menos relevancia, aunque aún puede ser de alguna ayuda en el seguimiento del hiperparatiroidismo acompañante a la insuficiencia renal. Recientemente se ha cuestionado la especificidad de los actuales métodos inmunológicos para medir la PTHi puesto que pueden mostrar una reacción cruzada con un gran fragmento carboxiterminal de la PTH (7-84). No obstante, no parece que los ensayos más específicos, que miden realmente sólo la PTH 1-84, aporten grandes ventajas diagnósticas frente a los métodos previos, al menos en los pacientes con función renal normal. Los métodos que utilizan la quimioluminiscencia ofrecen la posibilidad de determinar de forma rápida (entre 10 y 20 minutos), la evolución de los niveles plasmáticos de PTH durante la cirugía del HPP, lo que puede ser especialmente útil en casos complejos. La muestra de elección es suero que debe ser rápidamente separado y congelado puesto que la PTH es inestable. También puede utilizarse plasma obtenido a partir de la sangre anticoagulada con EDTA que parece estabilizar la muestra. En el caso de la determinación intraoperatoria de PTH, se utiliza plasma-EDTA, para no esperar la coagulación y poder analizar la muestra de manera inmediata. El intervalo de referencia de la

PTH en adultos es 20-65 pg/mL elevándose con la edad. El ejercicio intenso y, sobre todo, la utilización de drogas, como el litio o la furosemida, incrementan los niveles de PTH. Durante el embarazo pueden observarse valores de PTH bajos, sin alteraciones de la calcemia. La variabilidad intra e interensayo están en torno a 4-6 %, según los métodos (García-Unzueta 2004).

## 2. 2. Marcadores de remodelación ósea

Se han desarrollado en los últimos 20 años y son sensibles para la detección de anomalías en la tasa de remodelación ósea. Se han usado en investigación clínica y en ensayos clínicos de nuevos tratamientos como indicadores secundarios de la eficacia terapéutica. Sin embargo, su utilidad clínica en el manejo del paciente individual no está definida y sigue siendo materia de debate. Algunos de estos marcadores pueden reflejar tanto la existencia de formación como de remodelación mientras que otros son más específicos de alguno de los dos procesos. Por otra parte, muchos de ellos están presentes en otros tejidos distintos del hueso y pueden estar influidos por procesos extraesqueléticos. Los cambios en los marcadores de remodelación ósea normalmente no son específicos de una enfermedad concreta sino que reflejan alteraciones en el metabolismo óseo independientemente de la causa subyacente (Delmas *et al* 2000).

### 2. 2. 1. Limitaciones

Los marcadores de remodelación ósea tienen sus limitaciones técnicas y analíticas. Algunos marcadores son sensibles a la termodegradación, a la radiación ultravioleta, a la hemólisis y otras influencias del ambiente. Para obtener resultados con sentido, el manejo de las muestras debe estar protocolizado y proporcionar así condiciones reproducibles para su medida. Los ensayos utilizados para medir estos marcadores también deben estar estandarizados. Para hacer una interpretación clínica adecuada de los marcadores de remodelación ósea se debe tener en cuenta la variabilidad pre-analítica de los mismos. Existen múltiples fuentes de variabilidad biológica que pueden dividirse en factores no controlables y controlables. Los no controlables son edad, sexo, estado menopáusico, enfermedad o fractura reciente y deben ser registrados para hacer una interpretación adecuada de los niveles de los marcadores utilizando valores de referencia apropiados o haciendo ajustes individuales. Los factores controlables como el momento del día en que se hace la extracción (ritmo circadiano de los marcadores), menstruación o ejercicio pueden ser minimizados estandarizando el momento y las condiciones en que se toman las muestras. A pesar de todos estos intentos de identificar y minimizar las fuentes de variabilidad preanalítica, permanece una variabilidad endógena que no se puede reducir (Delmas *et al* 2000, Herrmann *et al* 2008, Singer *et al* 2008, Bergmann *et al* 2009).

### 2. 2. 2. Utilidad clínica

La mayoría de los estudios sobre su utilidad clínica se han realizado en mujeres postmenopáusicas. Los datos obtenidos de algunos estudios transversales sugieren que un

aumento sostenido en la remodelación ósea se asocia con mayor y más rápida pérdida de masa ósea. La relación entre marcadores de formación ósea y riesgo de fracturas son controvertidos. Por otra parte, los niveles elevados de marcadores de resorción ósea han mostrado una capacidad de predecir el riesgo de fractura vertebral y no vertebral independientemente del nivel de densidad mineral ósea y edad (Delmas *et al* 2000, Garnero 2000, Kraenzlin 2007, Navarro *et al* 2008). La elevación de los marcadores de remodelación ósea en varias determinaciones consecutivas debería ser considerado como factor de riesgo de pérdida ósea (Sornay-Rendu *et al* 2005, Ivaska *et al* 2008, Lenora *et al* 2008). Así, la combinación de ambos tests diagnósticos, marcadores de remodelación ósea y densitometría ósea, podría ser útil para mejorar la identificación de mujeres con un elevado riesgo de fracturas cuando la densidad mineral ósea por sí sola no es suficiente para valorar el riesgo de fractura. El resultado práctico de esta estrategia es que el número de mujeres que necesitan ser tratadas para evitar una fractura se reduce significativamente lo que resulta en una aproximación más coste-efectiva de la estrategia terapéutica. En este tipo de estrategia, los marcadores de remodelación ósea pueden utilizarse como factores de riesgo de fragilidad esquelética independiente de la densidad mineral ósea, del mismo modo que otros factores como la historia de fracturas o el bajo peso (Delmas 2000, Garnero 2008, Shiga *et al* 2009, Singer *et al* 2008). Otro uso clínico de los marcadores de remodelación ósea es la monitorización del tratamiento: eficacia y cumplimiento terapéutico. La ausencia de fracturas durante el tratamiento no implica necesariamente que esté siendo eficaz por lo que se necesitan otros métodos de evaluación del efecto terapéutico (Bauer *et al* 2004, Eastell *et al* 2003, Chen *et al* 2005). El procedimiento habitual para evaluar la eficacia es la medida de la densidad mineral ósea (DMO), pero los cambios en la DMO se producen de forma muy lenta y los efectos sobre ella no se detectan antes de 1 ó 2 años desde el inicio del tratamiento. Sin embargo, los cambios en los marcadores de remodelación ósea ocurren de forma mucho

más rápida. En varios estudios de intervención se ha demostrado un rápido descenso en los marcadores de resorción a las 2-4 semanas de tratamiento llegando a una fase estable después de 3-6 meses. El descenso en los niveles de marcadores de formación está algo más retrasado y alcanza una fase estable después de 6-12 meses. La magnitud del descenso en los marcadores varía en función de la potencia antiresortiva del fármaco empleado (Kraenzlin 2007, Singer *et al* 2008, Bergmann *et al* 2009).

En varones a partir de los 60 años de edad, parece que niveles mayores de marcadores de remodelación ósea correlacionan con menor DMO (Szulc *et al* 2001).

### **2. 2. 3. Marcadores bioquímicos de formación ósea**

Son productos directos o indirectos de los osteoblastos activos expresados durante las diferentes fases de su desarrollo o productos derivados de la formación del colágeno que reflejan los diferentes aspectos de la función del osteoblasto y de la formación de hueso. Todos los marcadores de formación ósea se miden en suero o plasma (Seibel 2000, Delmas 2000 *et al*).

#### **2. 2. 3. 1. Fosfatasa alcalina (FA)**

Es una enzima ubicua unida a membranas. Juega un importante papel en la regulación de la mineralización del osteoide pues hidroliza el pirofosfato para liberar fosfato que puede participar junto con el calcio en la formación de la hidroxiapatita. Los procesos que generan pirofosfato inhiben la mineralización y los que degradan pirofosfato y generan fosfato promueven la mineralización (Collins *et al* 2011).

El conjunto total de FA consiste en varias isoformas que se originan en diversos tejidos: hígado, hueso, intestino, bazo, riñón y placenta. En adultos con función hepática normal, el 50 % de la actividad sérica de FA deriva del hígado y el otro 50 % proviene del hueso. En niños y adolescentes la isoforma ósea alcanza el 90 % debido al crecimiento del esqueleto. Debido a la gran disponibilidad de métodos para su detección baratos y sencillos, es el marcador de metabolismo óseo más utilizado. Una vez descartada enfermedad hepática, la FA total es un buen marcador de formación ósea y de la actividad osteoblástica. Desde una perspectiva clínica, la medida de la isoenzima ósea de la FA aporta mayor especificidad (Seibel 2000, Delmas *et al* 2000, Navarro *et al* 2008).

### **2. 2. 3. 2. Osteocalcina**

Es una proteína sintetizada exclusivamente por osteoblastos, odontoblastos y condrocitos hipertróficos. Puede interactuar con otras proteínas incluyendo receptores de superficie celular. La osteocalcina participa en el proceso de la mineralización del osteoide. Se considera un marcador específico de la función osteoblástica y una vez liberada por el osteoblasto, la mayor parte de la osteocalcina recién sintetizada se incorpora a la matriz ósea extracelular donde constituye un 15 % de la fracción proteica que no es colágeno. Una fracción menor se libera a la circulación (Seibel 2000). Los niveles de osteocalcina sérica intacta correlacionan con la tasa de formación ósea por lo que se suele considerar un marcador de formación ósea aunque a causa de que los fragmentos de osteocalcina se liberan de la matriz ósea durante la resorción, los ensayos que miden la osteocalcina circulante además de sus fragmentos reflejan formación y resorción. (Delmas *et al* 2000, Bauer *et al* 2004, Sornay-Rendu *et al* 2005, Navarro *et al* 2008). La función exacta de la osteocalcina en el hueso no está aún clara totalmente, recientes estudios sugieren la



posibilidad de que influye en el metabolismo energético modulando la producción y acción de la insulina (Singer *et al* 2008).

### **2. 2. 3. 3. Propéptidos del colágeno tipo 1**

Derivan del colágeno tipo 1 que es el tipo de colágeno más común en el hueso aunque también puede formar parte de otros tejidos: piel, dentina, córnea, vasos fibrocartílago y tendones. En el hueso, el colágeno es sintetizado por los osteoblastos en la forma de pre-procolágeno. Estas moléculas precursoras se caracterizan por una secuencia corta de señal y péptidos de extensión terminal: el propéptido amino-terminal (P1NP) y el propéptido carboxi-terminal (P1CP). Tiene mayor validez diagnóstica la medida del P1NP mediante inmunoensayos pues correlacionan con la formación ósea mientras que la relevancia del P1CP en la evaluación de las enfermedades óseas aún no está clara (Seibel 2000, Chen *et al* 2005, Garnero 2008).

### **2. 2. 4. Marcadores bioquímicos de resorción ósea**

La mayoría de los marcadores de resorción (excepto la fosfatasa ácida tartrato-resistente y la sialoproteína ósea) son productos de degradación del colágeno óseo. La mayoría de los ensayos para medir marcadores de resorción se hacían tradicionalmente en orina lo que aumentaba la variabilidad de las determinaciones. En la actualidad hay ensayos inmunológicos estandarizados que permiten medir estos marcadores en suero (Seibel 2000, Eastell *et al* 2003, Garnero 2008, Lenora *et al* 2008, Shiga *et al* 2009).

#### 2. 2. 4. 1. Hidroxiprolina

Constituye 12-14 % del contenido total en aminoácidos del colágeno maduro y se forma intracelularmente por la hidroxilación post-translacional de la prolina. 90 % de la hidroxiprolina liberada durante la degradación del colágeno óseo se metaboliza en el hígado y posteriormente se excreta en la orina donde puede ser detectada. La hidroxiprolina puede estar en otros tejidos como la piel y se libera a partir el metabolismo de la elastina. Por otra parte, la hidroxiprolina excretada en la orina puede derivar de la degradación del colágeno recién sintetizado, no sólo del maduro (Seibel 2000), además puede proceder de la degradación de colágeno procedente de otros tejidos diferentes al hueso y de la dieta (Delmas *et al* 2000). La hidroxiprolina urinaria se considera un marcador no específico del recambio del colágeno y en la actualidad se utiliza poco por lo complejo del método y escasa reproducibilidad además de por haber sido sustituido por otros marcadores con metodología más específica y reproducible (Seibel 2000).

#### 2. 2. 4. 2. Piridinolinas

Se forman durante la maduración extracelular del colágeno fibrilar. Los más utilizados son la piridinolina (también denominada Pylilinks) y la deoxipiridinolina (también denominada D-Pylilinks). Las estructuras de colágeno una vez sintetizadas son estabilizadas por fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas además de por la formación de puentes intra e intermoleculares (cross-links o pylilinks). Los enlaces trivalentes destacan como marcadores de recambio óseo fundamentalmente los del anillo piridinolínico. Durante la resorción ósea, las moléculas de colágeno unidas se rompen y los componentes de unión se liberan a la circulación y la orina. Sus niveles reflejan estrictamente la degradación de colágeno maduro. Aunque están presentes en otros tejidos, al ser éstos más estables y tener un menor recambio celular (cartílago, ligamentos, tendones...) su presencia en la orina deriva

principalmente del esqueleto y no está influida por la dieta. No obstante, los más específicos del metabolismo óseo son las deoxipiridinolinas. Son considerados uno de los mejores índices para evaluar la resorción ósea (Seibel 2000, Delmas *et al* 2000, Garnero 2008, Singer *et al* 2008, Navarro *et al* 2008).

#### **2. 2. 4. 3. Telopéptido aminoterminal del Colágeno tipo 1 (NTX)**

También es un producto de degradación del colágeno maduro, en concreto la fracción aminoterminal que en su estructura incluye puentes piridinólicos que dan estabilidad a la molécula. Puede determinarse en orina, siendo uno de los marcadores con mayor sensibilidad y especificidad. Actualmente se están desarrollando y estandarizando ensayos inmuno-específicos para la determinación de NTX en suero con un futuro muy prometedor en la evaluación del metabolismo óseo aunque se necesitan más estudios al respecto ya que con los métodos actuales no existe una buena correlación de los niveles del marcador entre suero y orina (Garnero 2008, Herrmann *et al* 2008).

#### **2. 2. 4. 4. Telopéptido carboxiterminal de la cadena alfa1 del Colágeno tipo 1 (Crosslaps $\beta$ , CTX)**

Son fragmentos telopéptidicos provenientes de la degradación del colágeno maduro tipo 1, que contienen en su secuencia un péptido de 8 aminoácidos (Gly-Lys-Ala-His- $\beta$ Asp-Gly-Gly-Arg) en su forma isomerizada  $\beta$ . Pueden determinarse en suero y orina mediante ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales específicos. Constituyen uno de los marcadores de resorción ósea patológica más sensibles y más utilizados actualmente en la práctica clínica. (Seibel 2000). En la actualidad se están desarrollando ensayos para la detección de la forma  $\alpha$ , no isomerizada, que traduciría la destrucción de colágeno “joven”, o lo que es lo mismo colágeno inmaduro, indicando una aceleración del metabolismo óseo. La

medida simultánea de ambas formas,  $\alpha$  y  $\beta$ , puede ser útil para calcular el índice  $\alpha$ -CTX-I/ $\beta$ -CTX-I como marcador de remodelación ósea. Por ejemplo, este índice está elevado en la orina de pacientes con enfermedad de Paget ósea no tratada en la que se produce formación y resorción ósea de forma precipitada con un incremento del  $\alpha$ -CTX-I. Por el contrario, el índice  $\alpha$ -CTX-I/ $\beta$ -CTX-I urinario disminuye después del tratamiento con bifosfonatos (Garnero 2008, Herrmann *et al* 2008, Navarro *et al* 2008).

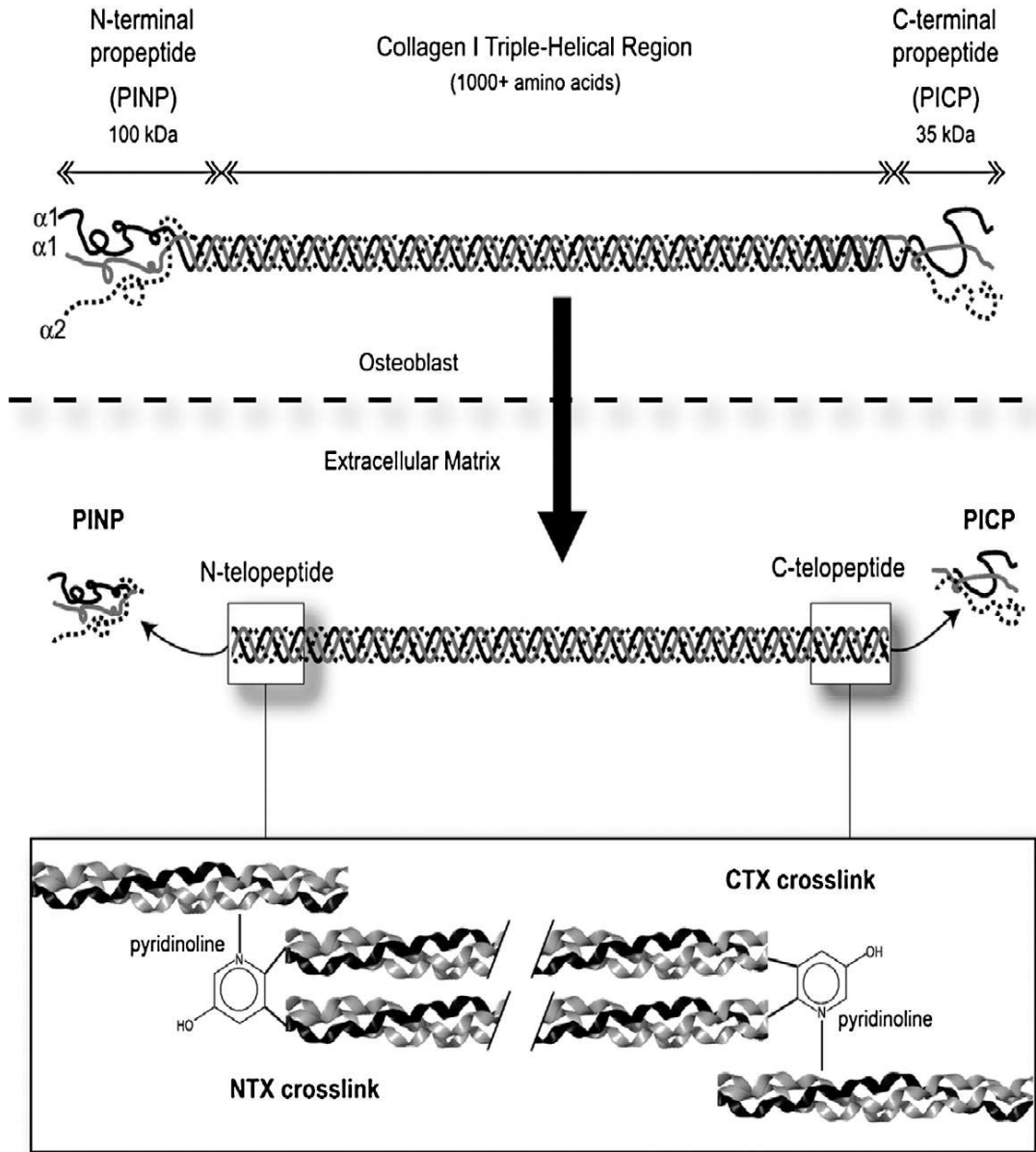
#### **2. 2. 4. 5. Sialoproteína del hueso**

Forma parte de 5-10% de la matriz no colágena del hueso. Es el principal producto sintetizado por los osteoblastos activos. Se detecta principalmente en tejido mineralizado como hueso, dentina y cartílago calcificado. Juega un papel importante en los procesos de adhesión y en la organización supramolecular de la matriz extracelular de los tejidos mineralizados. Sus niveles reflejan procesos relacionados con la resorción ósea aunque su ensayo aún no está estandarizado (Seibel 2000).

#### **2. 2. 4. 6. Fosfatasa ácida tartrato resistente**

Hay al menos 5 isoformas del enzima, expresadas por diferentes tejidos y células como próstata, hueso, bazo, plaquetas, eritrocitos y macrófagos, por lo que los primeros ensayos eran poco sensibles y poco específicos. Su origen es desconocido pero puede ser que se exprese por macrófagos. La isoforma 5b es la forma analizada en la actualidad para evaluación del metabolismo óseo; se expresa predominantemente en los osteoclastos y parece que representa el número y actividad de los mismos (Seibel 2000, Kraenzlin 2007).

Figura 4. Bases moleculares de los marcadores de remodelación ósea relacionados con la degradación del colágeno tipo 1 (Herrmann *et al* 2008).



### 3. EVALUACIÓN RADIOLÓGICA ÓSEA

#### 3. 1. Radiología convencional

La decreciente masa ósea en la osteoporosis se refleja radiológicamente de varias maneras creando diferentes patrones de hueso cortical y trabecular. La resorción de hueso trabecular e intracortical es característica de la osteoporosis postmenopáusica. La resorción del endostio es mayor en la osteoporosis senil y la subperióstica caracteriza el hiperparatiroidismo. La radiografía convencional no es útil para valorar la pérdida de densidad ósea en el hiperparatiroidismo primario asintomático (Adami *et al* 1998). Las fracturas vertebrales moderadas o severas son reconocidas con facilidad con los métodos radiológicos convencionales pero las deformidades ligeras son más difíciles de reconocer (Malouf *et al* 2004).

#### 3. 2. Tomografía axial computerizada (TC)

La TC es capaz de evaluar la masa trabecular y cortical por separado, así como las propiedades geométricas del hueso, facilitando así el cálculo de las fuerzas mecánicas. También es capaz de medir la densidad mineral volumétrica del hueso en lugar del área. La principal ventaja de la TC es la capacidad de diferenciar entre el hueso trabecular y el cortical. En los últimos años ha cobrado un mayor protagonismo para la medición de la

densidad mineral ósea (DMO) debido a la introducción de un software que permite el estudio histológico del hueso (Malouf *et al* 2004).

### 3. 3. Densitometría ósea

Es una técnica diagnóstica esencial para la valoración indirecta de la resistencia de los huesos y el análisis del riesgo de fractura individual. Este método mide cuantitativamente la densidad de los depósitos minerales de los huesos. Las personas que cuentan con una densidad mineral ósea significativamente más baja que otras de similar edad y sexo son más susceptibles de padecer fracturas. La DMO justifica hasta un 85 % de la resistencia efectiva y por este motivo su medida es tan importante para la evaluación del estado del esqueleto. En su mayoría estas técnicas se basan en el uso de los rayos X pero también se utilizan los ultrasonidos. La técnica de medida de la densitometría ósea más difundida es la absorciometría radiológica de doble energía (DXA). Su fuente emisora de energía son los rayos X que experimentan una atenuación al interactuar con la materia que atraviesan que depende de la energía de los rayos, de la naturaleza y grosor de los materiales a atravesar. En todas las técnicas de densitometría los resultados se ofrecen en forma de valores absolutos y relativos (comparados con los valores de referencia). Los resultados relativos se ofrecen utilizando la puntuación T o T-score que supone la comparación de la medida obtenida respecto al valor medio máximo que se alcanza en el momento de mayor madurez del esqueleto (pico de masa ósea) y de la puntuación Z que es la comparación del valor obtenido con el valor medio de la población de similar sexo y edad que el paciente. Para ambos se utiliza como unidad la desviación estándar frente a la población de referencia. El

riesgo de fractura de cadera, columna lumbar y antebrazo aumenta de 1,5 a 2,5 veces por cada disminución de una desviación estándar (DE) en la DMO con respecto a controles de la misma edad (Delmas *et al* 2000). Existe una relación exponencial entre pérdida de DMO y el incremento en el riesgo de fractura. Según la OMS (Alexeeva *et al* 1994) la clasificación según resultados de puntuación T son los siguientes (sólo han sido diseñados para mujeres de raza blanca postmenopáusicas):

- Normal: T superior a  $-1$  DE
- Osteopenia: T entre  $-1$  y  $-2,5$  DE
- Osteoporosis: T igual o inferior a  $-2,5$  DE
- Osteoporosis establecida o severa: T igual o inferior a  $-2,5$  DE y presencia de fractura

La densitometría ósea también sirve para el seguimiento de los cambios en el contenido mineral de una región ósea. Utilizando DXA la mejor región ósea para la monitorización es la columna lumbar en proyección postero-anterior (Río *et al* 2004). Se asume, pero no está firmemente establecido, que la reducción en DMO en el hiperparatiroidismo primario (HPP) predice el riesgo de fracturas de un modo similar a como lo hacen en poblaciones sin HPP (Bilezikian *et al* 2002).



## 4. HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

### 4. 1. Definición

El hiperparatiroidismo primario se define por una anomalía primaria en el tejido paratiroideo que conduce a la secreción inapropiada de hormona paratiroidea (PTH). Es la causa más frecuente de hipercalcemia en el paciente ambulatorio. Puede manifestarse en personas de cualquier edad pero es más frecuente en personas mayores de 50 años y en mujeres, 73 % en Silverberg *et al* 2009. La media de edad al diagnóstico es 55 años

### 4. 2. Etiología y fisiopatología

Normalmente es una enfermedad esporádica aunque hay descritas formas familiares. En el 85 % de los pacientes la causa subyacente es un adenoma en una de las glándulas paratiroides. La hipertrofia o hiperplasia de las 4 glándulas o los adenomas múltiples forman parte del 15 % restante. Las causas malignas representan menos de un 0,5 % de los casos. Un pequeño porcentaje de pacientes tienen antecedentes de irradiación cervical externa o reciben tratamiento con litio. En un 10-20 % de los pacientes el HPP está causado por una hiperfunción de múltiples glándulas heredada; estos pacientes suelen ser diagnosticados en edades más tempranas y en ellos hay que tener en cuenta y evaluar la existencia de cualquiera de las siguientes enfermedades: las Neoplasias Endocrinas Múltiple (NEM) tipo I y II, el recientemente descrito NEM tipo IV (Georgitsi 2010), el hiperparatiroidismo primario

neonatal severo, síndrome de hiperparatiroidismo y tumor mandibular, hipercalcemia hipocalciúrica familiar e hiperparatiroidismo familiar aislado (Bringham *et al* 2009).

Los adenomas paratiroides están causados por mutaciones en el ADN de las células paratiroides. Estas mutaciones confieren una característica de aumento de proliferación o de supervivencia de las células afectadas sobre sus vecinas normales. Como consecuencia, las descendientes de una célula paratiroidea particular, un clon de células, presentan una expansión clonal para producir un adenoma. Como se espera de una enfermedad causada por mutaciones en el ADN, los adenomas paratiroides ocurren con más frecuencia en pacientes sometidos a radiación cervical en las décadas previas. La mayoría de pacientes no tienen una historia de exposición a mutágenos específicos.

Hay indicios de que anomalías en la fisiología de la vitamina D predisponen al HPP pues los pacientes con adenomas paratiroides tienen mayor probabilidad de heredar un alelo particular del gen receptor de la vitamina D (VDR) (Carling *et al* 1995). En cultivos de células paratiroides procedentes de adenomas extirpados de pacientes con HPP se ha demostrado que los factores de crecimiento TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento de transformación beta 1), IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) inducen proliferación celular (Cavallaro *et al* 2010).

Se desconoce la causa de la hiperplasia paratiroidea primaria esporádica. Los estímulos conocidos para la proliferación celular paratiroidea –niveles disminuidos de calcio sanguíneo o del 1,25(OH)<sub>2</sub> D no están presentes en esta enfermedad-. Presumiblemente, otros estímulos fuera de las glándulas paratiroides o una anomalía genética presente en las cuatro glándulas conducen a una proliferación celular inapropiada. Tales anomalías se han encontrado en varias formas hereditarias de la hiperplasia de paratiroides, pero la mayoría de los casos de hiperplasia no se encuentran en grupos familiares. Está bien

definida la distinción teórica entre un adenoma como una proliferación clonal y la hiperplasia como un crecimiento policlonal aunque la mayoría de las formas de hiperplasia paratiroidea, que puede empezar con un estímulo para una proliferación policlonal de células paratiroideas, también representan una expansión monoclonal. Se han identificado tumores monoclonales paratiroideos en algunas formas de hiperplasia. Esto sugiere que la distinción entre la hiperplasia y el adenoma paratiroideo puede ser artificial y explicar por qué las técnicas histopatológicas disponibles no pueden distinguir entre las dos lesiones (Al Zahrani *et al* 1997). Un aumento en el número celular no es la única anomalía en el HPP. Cabe esperar que la capacidad de una célula paratiroidea normal para suprimir la secreción de PTH en respuesta a la hipercalcemia pueda proteger de la hipercalcemia sostenida, incluso si el número de las células paratiroideas aumenta de forma moderada. Las células paratiroideas de los adenomas responden a cambios en el calcio extracelular con aumentos pequeños más que normales en el calcio intracelular y se reduce en la superficie celular el número de receptores sensibles al calcio (Bringhurst *et al* 2009). En los adenomas de pacientes con HPP hay reducciones en los niveles proteicos y de mRNA del CaR (receptor del calcio) comparado con los niveles en glándulas paratiroides normales. Estas disminuciones en la expresión del CaR probablemente contribuyen significativamente a incrementar los puntos de ajuste de los adenomas paratiroideos (Brown *et al* 1998).

### 4. 3. Incidencia y prevalencia del HPP

La incidencia del HPP ha aumentado drásticamente desde la década de 1970 en que se introdujeron los analizadores bioquímicos multicanal y el calcio se incluyó en la rutina bioquímica. Se estima que la incidencia es de 27,7 casos/100.000 individuos y año aunque desde 1992 parece que la incidencia se ha reducido a 4 casos/100.000 individuos por año quizá por un descenso en el uso de la determinación de calcio de forma rutinaria, por una verdadera disminución de la incidencia de la enfermedad o simplemente por efecto residual de “limpieza” de una enfermedad subclínica en las tres décadas pasadas (Taniegra 2004, Cormier *et al* 2004, Younes *et al* 2005). En un estudio reciente sobre población escocesa (Yu *et al* 2009) la incidencia en el período de 1997 a 2006 fue desde 4,13 (mínimo) casos por 10.000 individuos por año en 1997 a 11,3 (máximo) en 2000. Por otra parte, que la hipercalcemia clínica sea el gran criterio diagnóstico puede subestimar la verdadera incidencia de la enfermedad.

La prevalencia en población general es de 1/1.000 individuos y en mujeres postmenopáusicas la prevalencia es de 21/1000 mujeres entre 55 y 75 años (Taniegra 2004, Cormier *et al* 2004, Younes *et al* 2005). En la población escocesa mencionada previamente la prevalencia aumentó de 1,82/1000 en 1997 a 6,72/1000 en 2006 (Yu *et al* 2009). La prevalencia en varones suecos de entre 69 y 81 años fue de tan solo 0,73 % (Siilin *et al* 2011). En una gran población de mujeres suecas que se sometían a estudios mamográficos de rutina con edad media de 66 años, la prevalencia del HPP combinando niveles de calcio en el límite alto de normalidad y PTH elevada o en el límite alto de la normalidad como criterios diagnósticos fue de 2,1 % (Lundgren *et al* 1997).

#### 4. 4. Manifestaciones Clínicas del HPP

Actualmente se considera que la mayoría de los pacientes que padecen HPP se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico. El espectro clínico del HPP cambió drásticamente a principios de la década de 1970 con la introducción del estudio de rutina químico multicanal sérico con el cual se detectó una población grande de pacientes con enfermedad asintomática no sospechada previamente. Hoy en día la mayor parte de los HPP se diagnostican de forma incidental y se consideran asintomáticos, pues muy pocos pacientes presentan signos o síntomas clínicos de la enfermedad clásica y si lo hacen suele ser la urolitiasis. Algunos pacientes presentan síntomas neuropsiquiátricos que pueden mejorar tras la cirugía aunque muchos de estos síntomas son inespecíficos (astenia, debilidad, pérdida de memoria, depresión, somatización, polidipsia, poliuria, dolor óseo y articular) y son frecuentes también en personas sin HPP.

En el HPP clásico o sintomático las manifestaciones clínicas principales son secundarias a la hipercalcemia e incluyen enfermedad ósea, litiasis renal y otros síntomas inespecíficos gastrointestinales, cardiovasculares y de disfunción neuromuscular.

En el HPP actual o asintomático, los pacientes no tienen síntomas de hipercalcemia. Hay algunos síntomas y signos que pueden estar presentes pero que no están claramente asociados con el HPP incluyendo hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, calcificación valvular o miocárdica, úlcera péptica, pancreatitis, gota o pseudogota, anemia normocítica normocrómica, debilidad, astenia, ansiedad, déficit cognitivos y depresión (Taniegra 2004).

Existe una entidad, el HPP normocalcémico, que parece corresponder a una fase inicial en la historia natural del HPP en la que los niveles de PTH están elevados pero el calcio aún no. Sí puede demostrarse en esta fase la existencia en muchos casos de afectación ósea cortical y litiasis renal. En un estudio sobre 37 pacientes con HPP

normocalcémico, un 20 % desarrollaron hipercalcemia franca en los primeros 3 años de seguimiento (Lowe *et al* 2007).

#### 4. 4. 1. Afectación ósea

Histológicamente está aumentada la proporción de ciclos de remodelación ósea activados. La PTH aumenta la remodelación ósea y el número de osteoclastos y osteoblastos pero reduce la actividad de las células óseas individuales lo que lleva a un período de remodelación más prolongado (Mosekilde 2008). Esta prolongación en el tiempo aumenta el volumen del espacio de remodelación y la porosidad del hueso puesto que la fase de formación de hueso de cada punto de remodelación es mucho más larga que la fase inicial de resorción. Por razones aún no conocidas, el equilibrio que se alcanza entre la resorción aumentada y la formación de hueso no depende sólo de la gravedad del HPP sino del tipo de hueso predominando la resorción del endostio, aumento de la porosidad y adelgazamiento del córtex en el hueso cortical y la aposición de mineral en el hueso trabecular (aunque en grado menor a la resorción en hueso cortical). En el endostio, la resorción osteoclástica está aumentada llevando a un adelgazamiento cortical; en el hueso cortical hay un aumento de ciclos de remodelación activos aumentando el espacio de remodelación y la porosidad (Brockstedt *et al* 1995, Mosekilde 2008).

Marcadores de remodelación ósea: Los marcadores de formación ósea – osteocalcina- y de resorción ósea –deoxipiridinolina- están elevados en un 75 % de los casos mostrando un incremento en la tasa de remodelación ósea y se normalizan tras la cirugía curativa (Mosekilde 2008). Un estudio demostró elevación de marcadores de remodelación

ósea y expresión aumentada de su mRNA de forma paralela en pacientes con HPP (Reppe *et al* 2006).

En el HPP leve la pérdida de masa ósea no suele apreciarse en las radiografías (Adami *et al* 1998) aunque la DMO pueda estar reducida particularmente en puntos de hueso de predominio cortical como es la metáfisis del radio. La masa ósea trabecular, como en los cuerpos vertebrales, se preserva y habitualmente es normal (Parisien *et al* 1995, Dempster *et al* 2007, Dempster *et al* 2009, Bilezikian *et al* 2005). Este aspecto ha sido estudiado también mediante biopsias de cresta ilíaca en pacientes con HPP vs sujetos control objetivando afectación del hueso cortical y preservación del volumen de hueso trabecular (Silverberg *et al* 1989). Se sospecha que la pérdida cortical de DMO ocurre en una fase muy temprana de la enfermedad, mucho antes de que se manifieste la hipercalcemia que llevará al diagnóstico (Rubin *et al* 2008).

Tras la paratiroidectomía se han encontrado ganancias variables de DMO: hasta un 12 % en 4 años en columna vertebral y cuello femoral y de tan solo un 4 % en radio. La masa ósea no mejora o mejora poco en los puntos con hueso cortical (radio distal) pero sí se producen cambios estructurales: el espesor cortical relativo se incrementa tras la cirugía eficaz y la porosidad cortical disminuye. En los siguientes periodos postoperatorios (1, 5 y 10 años) los incrementos correspondientes en la DMO en columna lumbar son de un 9, 6 y 12 %, en cuello femoral: 1, 7 y 10 %, y en radio distal: 4, 8 y 7 % (Rubin *et al* 2008). El incremento en densidad ósea tras la cirugía es mayor en pacientes que partían de niveles más bajos (Cormier *et al* 2004). Bollerslev encontró un aumento de 2,7 % de DMO en columna lumbar y de un 1,1 % en cuello femoral acompañado de una reducción de un 35 % de los marcadores de remodelación ósea a los 2 años de la cirugía (Bollerslev *et al* 2009). Rao *et al* en un pequeño grupo de pacientes HPP operados encontró un aumento de DMO de 1,2 % al año en columna lumbar, de un 0,4 % / año en cuello femoral y antebrazo y de un 0,3

% / año en cadera total (Rao *et al* 2004). En un reciente meta-análisis (Sankaran *et al* 2010) en pacientes con HPP leve el efecto de la cirugía se estimó entre un 4 y un 8 % de mejoría en DMO en columna lumbar, entre 3,5 y 4 % en cadera y entre un 2,5 y un 4 % en radio distal. El incremento en la DMO después de una paratiroidectomía eficaz se mantiene hasta 15 años después de la operación (Rubin *et al* 2008).

La afectación ósea en pacientes sintomáticos o en el HPP clásico se denomina osteítis fibrosa quística. Se caracteriza por un aumento importante y generalizado en la resorción osteoclástica del hueso acompañado de reemplazamiento fibrovascular de la médula y de elevada actividad osteoblástica. Desmineralización generalizada en el hueso de patrón trabecular (resorción osteoclástica de las trabéculas más pequeñas) y resorción perióstica que puede progresar hasta resorción cortical extensa. Aparecen también quistes óseos, generalmente múltiples que contienen un líquido marrónáceo mucoso o seroso especialmente en porción medular de los metacarpianos, costillas o pelvis. Otras expresiones de la enfermedad son los osteoclastomas o tumores pardos compuestos de numerosos osteoclastos multinucleados (células gigantes) mezclados con células del estroma y de la matriz que habitualmente se encuentran en las porciones trabeculares de la mandíbula, huesos largos y costillas.

Finalmente otra importante manifestación son las fracturas patológicas. Radiológicamente es característica la aparición en la radiografía craneal de un patrón en “sal y pimienta” con pérdida de la definición de la corteza interna y externa y la desaparición radiográfica de algunos huesos: falanges distales de las manos, corteza inferolateral del tercio distal de la clavícula, cúbito distal, etc... Las manifestaciones clínicas de estos cambios incluyen dolor y sensibilidad ósea, cifosis y pérdida de talla, etc... (Bringhurst *et al* 2009).

En cuanto a si el HPP aumenta el riesgo de fracturas, algunos estudios como el de Larsson realizado sobre población sueca (Larsson *et al* 1993) no han encontrado aumento de



riesgo de fracturas en cadera en pacientes con HPP. Otros estudios encontraron un aumento de un 10 % en el riesgo de cualquier tipo de fractura (Melton *et al* 1992). En un estudio realizado en Rochester-Minnessotta entre 1965 y 1992 se encontró que el RR (riesgo relativo) fue significativamente elevado para fracturas vertebrales (3,2 veces), antebrazo distal (2,2 veces) y costillas (2,7 veces) aunque no para las fracturas de cadera (Khosla *et al* 1999). El riesgo total de fractura en cualquier punto fue significativamente mayor (1,3 veces) y tan elevado en los diagnosticados incidentalmente como en los pacientes diagnosticados previamente a la introducción de los cribados bioquímicos automatizados. En la misma comunidad en un estudio realizado en 2002 (Melton *et al* 2002) se confirmaron los datos para fractura vertebral y de antebrazo y se observó un riesgo de fracturas de cadera 1,5 veces el de los sujetos control. En población danesa (Vestergaard *et al* 2000) se encontró un aumento del riesgo relativo de fracturas vertebrales (3,5 veces), en extremidades superiores y clavícula (1,2 veces), en antebrazo (1,9 veces) y en cuello femoral (1,4 veces). Este aumento del riesgo de fracturas en cualquier localización discrepa con la pérdida de densidad mineral ósea objetivada mediante DXA e histología predominante en hueso cortical y el aumento en el hueso trabecular. Hay que tener en cuenta que la DMO es sólo una más de las cualidades del hueso que pueden influir sobre el riesgo de desarrollar fracturas (Bilezikian *et al* 2005).

Lo que también se desconoce es si el riesgo de fracturas disminuye en el HPP leve tras una paratiroidectomía eficaz pues algunos estudios no encuentran un aumento del riesgo de fracturas respecto a controles tras la cirugía mientras que otros refieren un aumento de riesgo de fractura de radio distal congruente con la escasa ganancia de masa ósea a la que nos referíamos anteriormente. Vestergaard (Vestergaard *et al* 2000) observó una reducción del riesgo de fracturas tras paratiroidectomía a niveles similares a la población general en columna vertebral y antebrazo pero no en cuello femoral. Parece que el riesgo de fracturas vuelve al nivel de los controles en los siguientes 2 años tras la paratiroidectomía.

#### 4. 4. 2. Manifestaciones renales

Actualmente sólo aparece litiasis renal en el 10-25 % de los pacientes con HPP (Silverberg *et al* 2009). Sin embargo en más de un tercio de los pacientes asintomáticos aparece algún grado de deterioro de la función renal, junto a una reducción significativa de aclaramiento de creatinina o deterioro de la capacidad de acidificación. Menos de un tercio de los pacientes con HPP e hipercalciuria desarrollan cálculos aunque es más probable que aquellos que desarrollan litiasis sean hipercalciúricos (Bringham *et al* 2009, Odvina *et al* 2007). En un estudio reciente se confirmó que los pacientes con litiasis renal tenían niveles mayores de calciuria, menor volumen total urinario, menores niveles de fósforo sérico, había más proporción de pacientes varones y la edad media era menor que en los pacientes con HPP que no padecían de litiasis renal (Odvina *et al* 2007).

Clásicamente era frecuente la nefrolitiasis cálcica recurrente, nefrocalcinosis y deterioro de la concentración urinaria que puede llevar hasta la insuficiencia renal terminal. Los síntomas y signos asociados incluyen dolor abdominal, poliuria y polidipsia. Los cálculos pueden estar compuestos de fosfato de calcio o de oxalato y fosfato de calcio. En los pacientes diagnosticados antes de 1965 la frecuencia de la nefrolitiasis en el HPP era del 60-80 %. La nefrocalcinosis consiste en la presencia de calcificaciones bilaterales que se aprecian en la radiografía simple de abdomen a nivel de las pirámides y médula renal y que se correlacionan con la presencia de depósitos de calcio en el epitelio de los túbulos renales (Bringham *et al* 2009).

#### 4. 4. 3. Otras manifestaciones

Otras manifestaciones del HPP son: calcificaciones conjuntivales, queratopatía en banda, hipertensión, signos y síntomas gastrointestinales (anorexia, náuseas, vómitos, estreñimiento), úlcera péptica, pancreatitis aguda o crónica, síntomas derivados de la hipercalcemia *per se* (debilidad, apatía, depresión, poliuria, estreñimiento, coma).

En referencia a los síntomas neuropsiquiátricos, su presencia y gravedad correlaciona poco con las concentraciones de calcio sérico. Los pacientes con HPP leve tienen claras quejas neuropsicológicas y fundamentalmente se han realizado estudios basados en cuestionarios de calidad de vida observando peores puntuaciones en sujetos con HPP vs sujetos control (Bollerslev *et al* 2007, Siilin *et al* 2008). Existen algunos datos que apoyan un beneficio modesto de la paratiroidectomía en la calidad de vida y función psicológica (Rao *et al* 2004, Pasieka *et al* 2009, Walker *et al* 2009). Se necesitan más esfuerzos para definir los déficits neuropsicológicos y cognitivos específicos del HPP (Silverberg *et al* 2009).

En cuanto al HPP y el exceso de riesgo cardiovascular, se ha observado exceso de riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular durante el seguimiento de pacientes con HPP leve en comparación con la población general. También se ha descrito un mayor riesgo de padecer insuficiencia renal, hipertensión arterial y diabetes (Yu *et al* 2010). Se ha descrito en el HPP calcificación cardíaca anormal e hipertrofia ventricular izquierda (Bringhurst *et al* 2009). En enfermedad leve hay evidencia de manifestaciones sutiles como cambios en la función de endotelio y rigidez vascular (Rubin *et al* 2005). Los niveles de PTH y no los de calcio séricos han demostrado ser un factor predictor independiente de grosor de la íntima media y de rigidez de la pared carotídea (Walker *et al* 2009). Incluso en población general en ausencia de HPP o de cualquier anomalía en la homeostasis del calcio, los niveles de PTH

se han asociado con un riesgo aumentado de mortalidad cardiovascular independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular y de factores relacionados con el metabolismo óseo. La PTH se ha implicado en la aterogénesis mediante la calcificación y la remodelación vasculares además de tener efectos deletéreos en el miocardio al inducir hipertrofia ventricular, calcificación cardíaca y fibrosis (Hagström *et al* 2009, Persson *et al* 2010, Walker *et al* 2010). No hay evidencia de que marcadores de riesgo cardiovascular mejoren tras la cirugía en el HPP leve (Bollerslev *et al* 2009, Persson *et al* 2010). Si se demostrase que las anomalías cardiovasculares son reversibles en el HPP asintomático podrían cambiarse las recomendaciones actuales para la paratiroidectomía (Silverberg *et al* 2009). Recientemente se ha demostrado reducción significativa de los niveles de presión arterial post paratiroidectomía (Heyliger *et al* 2009, Farahnak *et al* 2010).

## **4. 5. Diagnóstico del HPP**

### **4. 5. 1. Calcio y PTH**

Hipercalcemia persistente y PTH elevada confirman el diagnóstico de hiperparatiroidismo primario. Estas determinaciones deben ser realizadas en ayunas y con la menor oclusión venosa posible. Todas las concentraciones de calcio total deben ser corregidas por la concentración de albúmina sérica. Los niveles de calcio iónico no se afectan por los niveles de albúmina aunque esta determinación no suele solicitarse habitualmente pues en muchos centros médicos no se dispone de ella. Los niveles de calcio total pueden

estar dentro de la normalidad, entre 4,5 y 22 % de los pacientes mientras que el calcio iónico está elevado en el 98 % de los casos (Bilezikian *et al* 2002, Bringhurst *et al* 2009).

La PTH intacta (la secuencia completa desde el aminoácido 1 al 84) puede medirse con técnicas inmunoradiométricas o inmunoquímicas. Tanto los ensayos de 2ª como los de 3ª generación tienen una sensibilidad similar para detectar niveles elevados de PTH. En aproximadamente un 10 % de pacientes los niveles de PTH no están elevados pero sí en el límite alto de normalidad. El déficit de vitamina D puede producir niveles de calcio falsamente normales. Se necesitaría disponer de intervalos de referencia de los niveles de PTH en relación con los de 25-OH-D (Eastell *et al* 2009) además de tener en cuenta otros factores que también pueden alterarlos como la edad, el sexo, la raza, el filtrado glomerular y el IMC.

#### 4. 5. 2. Vitamina D

La determinación de vitamina D debería realizarse en todos los pacientes con HPP siguiendo las recomendaciones del 3er Workshop (Eastell *et al* 2009). Los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> D suelen estar normales o ligeramente elevados respecto de los rangos de referencia. Se ha sugerido un mayor déficit de vitamina D en pacientes con HPP respecto de sujetos control (Moosgard *et al* 2005). Las posibles causas teóricas de este déficit serían por una parte la degradación acelerada de 25-OH-vitamina D pues los elevados niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> D aumentan la actividad de la hidroxilasa 24,25 renal. Por otra parte, la producción aumentada de 1,25(OH)<sub>2</sub> D renal propia del HPP es difícil que reduzca por sí sola los niveles de 25-OH-vitamina D porque los niveles de sustrato de ésta son 500 a 1000 mayor que los de 1,25(OH)<sub>2</sub> D. Otra teoría puede ser una reducción de la producción en la piel de vitamina D a través de la proliferación epidérmica de melanocitos. En pacientes sin déficit de vitamina D

parece ser más frecuente la enfermedad litiásica renal debido a un aumento en la absorción intestinal y aumento en la excreción renal de calcio además de tener niveles menores de PTH y menor afectación ósea en consecuencia, al parecer debido al efecto de retroalimentación negativo entre la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  y la PTH. En pacientes con déficit de vitamina D la liberación de PTH es mayor por ausencia de retroalimentación negativa y por tanto se producen lesiones óseas con más frecuencia. La deficiencia crónica de vitamina D teóricamente podría acelerar la proliferación de las células paratiroideas y aumentar el riesgo de mutaciones somáticas esporádicas y el crecimiento de un adenoma. Existe controversia sobre si los niveles de vitamina D correlacionan de forma inversa con el tamaño del adenoma (Mosekilde 2008, Adam 2010). Hay que tener en cuenta que los pacientes ancianos tienen más déficit de vitamina D que los más jóvenes y por tanto son más propensos a tener enfermedad ósea derivada del HPP. Así, los niveles bajos de vitamina D se han asociado a mayores niveles de PTH y a valores más elevados de densidad mineral ósea o aposición ósea a nivel de columna vertebral (hueso trabecular) y más bajos o mayor porosidad en hueso cortical (radio distal) (Cormier *et al* 2004, Stein *et al* 2010).

#### 4. 5. 3. Fósforo y FGF-23

Es frecuente encontrar hipofosfatemia en estos pacientes. Además, la excreción urinaria de calcio está elevada en un 30-40 % de pacientes. El factor 23 de crecimiento de los fibroblastos (FGF-23) es una proteína recientemente identificada que se produce principalmente en el hueso y su síntesis está fuertemente regulada por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Es un factor regulador del metabolismo del fosfato ejerciendo efectos sobre la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal y sobre el cotransportador Na/P del riñón expresado en el borde en cepillo de la membrana de

las células epiteliales del túbulo proximal. Actúa mediante receptores específicos que necesitan a Klotho como cofactor (Klotho es una proteína transmembrana que controla la sensibilidad a la insulina y parece participar en el proceso de envejecimiento). La administración de FGF-23 reduce la expresión del mRNA de la  $1\alpha$  hidroxilasa y aumenta los niveles plasmáticos de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ . Los resultados de los estudios sobre el FGF-23 en el HPP son controvertidos pero parecen sugerir que sus niveles séricos medios están elevados. Este incremento es dependiente del aclaramiento de creatinina por lo que se observa antes en sujetos con insuficiencia renal crónica. Sus niveles son independientes del grado de hipercalcemia. Se puede observar una correlación positiva con los niveles de PTH que podría estar mediada por el incremento de la producción renal de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  mediada por PTH. El FGF-23 podría agravar la tendencia a hipofosfatemia y aumentar el déficit mineral óseo (Mosekilde 2008).

#### 4. 5. 4. Evaluación de afectación sistémica

Una vez confirmado el HPP bioquímico se debe realizar evaluación de afectación de los órganos con mayor probabilidad de estar afectados por el HPP: hueso y riñones (Bilezikian *et al* 2002). Esta evaluación forma parte del estudio de los criterios quirúrgicos en cada paciente individual.

Se debe medir densidad mineral ósea en columna lumbar, cadera y antebrazo siendo de elección la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) y de complicaciones renales mediante ecografía abdominal si se sospecha nefrolitiasis (Eastell *et al* 2009).

Como estimación del filtrado glomerular el 3<sup>er</sup> Workshop (Eastell *et al* 2009) recomienda ecuaciones basados en datos antropomórficos (no en caso de dietas vegetarianas,

suplementos de creatina o gran reducción de masa muscular como malnutrición o amputación) y bioquímicas. Las ecuaciones recomendadas son la derivada del estudio de la Modificación de la Dieta en la Enfermedad Renal (MDRD) y la ecuación Cockcroft-Gault. El grupo del consenso prefiere la fórmula de MDRD porque es más exacta para estimar el filtrado glomerular y recomiendan utilizar un filtrado glomerular de 60 mL/min como umbral de enfermedad renal crónica y criterio quirúrgico.

#### **4. 5. 5. Estudios de imagen o localización**

Es recomendable realizar pruebas complementarias que diferencien entre adenoma o hiperplasia y den una orientación al cirujano sobre su localización (Cormier *et al* 2004). Estos estudios serían obligados en aquellos pacientes en quienes la primera operación fracasó en curación o en casos de recurrencia.

La técnica más adecuada de localización de lesiones pre-quirúrgica es el sestamibi Tecnecio (Tc) 99 (80-95 % de sensibilidad). Si se combina con PET la sensibilidad es del 91% y la especificidad del 98,8 % (Mariani *et al* 2003, Casanova 2005). Otros estudios como la ecografía, la tomografía computarizada (TC) o la resonancia nuclear magnética (RMN) proporcionan información adicional. El sestamibi localiza nódulos tiroideos los cuales pueden acompañar a la enfermedad de paratiroides en un 20-40 % de los pacientes. Por otra parte, la gammagrafía con sestamibi Tc 99 puede no detectar las glándulas pequeñas o múltiples glándulas anormales en casos de hiperplasia paratiroides, la causa más frecuente de persistencia del hiperparatiroidismo en el postoperatorio.

También se han utilizado técnicas más invasivas como la angiografía y muestras venosas selectivas de las venas yugulares para la medición de PTH aunque la sensibilidad



de estos procedimientos de detección de glándulas paratiroides anormales residuales es de tan solo 50-65 % (Alvarado *et al* 2010).

Hay grupos que defienden realizar la exploración quirúrgica del cuello sin técnicas de localización previas puesto que consideran que la mejor garantía de un buen resultado es un cirujano experimentado puesto que el valor predictivo positivo de la mejor técnica (gammagrafía con sestamibi Tc 99) es muy inferior a la tasa de éxitos de cirujanos expertos que no contaban con estudios de imagen previos. Otros grupos de cirujanos defienden los beneficios de una orientación preoperatoria sobre la localización del tejido patológico que puede permitir procedimientos más selectivos y muy especialmente en casos de lesiones ectópicas mediastínicas en que el cirujano no se ve obligado a hacer exploración del cuello. Los estudios de localización se consideran imprescindibles en casos en que una primera cirugía ha fracasado en su intento curativo persistiendo el hiperparatiroidismo y se necesita de una segunda intervención (Casanova 2005).

#### **4. 6. Tratamiento del HPP**

La curación permanente se consigue con la extirpación quirúrgica de las glándulas anormales, un tratamiento adecuado para los pacientes diagnosticados de la forma clásica grave de la enfermedad y continúa siendo el tratamiento de elección para aquellos pacientes con litiasis renal recurrente, nefrocalcinosis, enfermedad ósea clínica o hipercalcemia grave. Cuando se realiza por cirujanos expertos el porcentaje de éxito terapéutico es de 90-95% con escasas complicaciones (Bringhurst 2009).

En los pacientes con HPP asintomático la elección de tratamiento quirúrgico vs conservador es controvertida. A favor del tratamiento quirúrgico encontramos argumentos como:

- ✓ mejoría en la DMO tras la operación
- ✓ reversibilidad de la hipertrofia ventricular izquierda
- ✓ reducción del riesgo de fracturas
- ✓ reducción en la tasa de mortalidad cardiovascular y de neoplasias
- ✓ mejoría de síntomas neuropsiquiátricos
- ✓ el desarrollo de nuevos procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivo

La pérdida media de masa ósea en pacientes con HPP leve no operados descrita por un reciente meta-análisis es de 0,6 % anual en columna lumbar, de un 1 % en cadera y de un 0,7 % en radio (Sankaran *et al* 2010).

A favor del enfoque terapéutico conservador se encuentran:

- ✓ la falta de evidencia de progresión de la enfermedad en la mayoría de los pacientes asintomáticos no operados
- ✓ el riesgo de fracaso quirúrgico
- ✓ las complicaciones postoperatorias
- ✓ la falta de evidencia de que los pacientes con hipertensión, riesgo elevado de cáncer, fracturas o mortalidad cardiovascular se beneficien de una paratiroidectomía eficaz
- ✓ la disponibilidad de técnicas sensibles para monitorizar el estado de la enfermedad en los pacientes no operados.

No existen estudios prospectivos que comparen la evolución en los pacientes con HPP asintomáticos elegidos de forma aleatoria para el tratamiento quirúrgico con pacientes

asignados a un seguimiento médico. Las series quirúrgicas generalmente reflejan la evolución de los pacientes preseleccionados para someterse al tratamiento intervencionista.

**Criterios quirúrgicos establecidos por el 3<sup>er</sup> Workshop** (Bilezikian *et al* 2009)

1. HPP sintomático: síntomas y signos de hipercalcemia, nefrolitiasis, nefrocalcinosis, osteítis fibrosa quística, fracturas óseas, enfermedad neuromuscular.
2. HPP asintomático:
  - a. Niveles séricos de calcio >1,0 mg/dL por encima del límite alto de normalidad
  - b. Aclaramiento de creatinina menor de 60 mL/min
  - c. Fractura por fragilidad previa
  - d. Densidad mineral ósea (cadera total, cuello femoral, columna lumbar o antebrazo):
    - i. T-Score  $\leq$  -2,5 DE en mujeres peri y postmenopáusicas y en hombres de 50 o más años
    - ii. Z-Score  $\leq$  -2,5 DE en premenopáusicas y en varones menores de 50 años
    - iii. Recomiendan considerar cirugía en pacientes que tienen un descenso en la DMO igual o mayor que el menor cambio significativo (este valor deriva del cálculo de precisión, el cambio menor que es estadísticamente significativo con un 95 % de nivel de confianza)
  - e. Edad < 50 años
  - f. Seguimiento médico periódico no aceptado por el paciente o que no es posible

## g. Petición de cirugía por parte del paciente

Respecto a las guías de 2002 (Bilezikian *et al* 2002) se suprime el criterio de calciuria mayor de 400 mg/día aunque admiten que algunos médicos lo seguirán teniendo en cuenta.

#### 4. 6. 1. Tratamiento quirúrgico del HPP

El procedimiento quirúrgico habitual es la exploración bilateral del cuello identificando las cuatro glándulas paratiroides y extirpándose todas aquellas aumentadas de tamaño. Los expertos del 3<sup>er</sup> Workshop consideran que la variable más importante con efecto directo en las tasas de curación y de complicaciones es que el cirujano sea experimentado. Hay pocos datos publicados que evalúen directamente esta hipótesis, son los datos indirectos obtenidos de grandes bases de datos retrospectivas los que demuestran que la experiencia quirúrgica medida por número de casos al año es el factor predictor más importante de resultados clínicos y económicos. La inexperiencia o inhabilidad del cirujano es la principal causa de falta de eficacia de la paratiroidectomía incluso cuando ésta se complementa con la técnica de determinación de niveles de PTH intraoperatoria (Lew *et al* 2010). Las últimas recomendaciones mencionadas aceptan que si la cirugía va a ser realizada, el cirujano organice los estudios de imagen para localizar las glándulas anormales. Que los estudios de imagen sean negativos no deberían impedir la remisión de un paciente al cirujano o la propia intervención (Udelsman *et al* 2009).

Actualmente se han desarrollado procedimientos mínimamente invasivos unilaterales mediante endoscopia, asistidos por video o radio guiados utilizando anestesia local. (Taniegra 2004). Estos abordajes reducen el tiempo operatorio y se asocian con menos complicaciones, se pueden realizar con anestesia local y sedación intravenosa y permiten el

alta hospitalaria el mismo día y han sustituido a la exploración cervical clásica como la técnica de elección en pacientes con un estudio de localización positivo preoperatorio. Los resultados son similares a la cirugía convencional con las ventajas añadidas de menor tiempo operatorio, recuperación más rápida, mejor resultado estético y menor frecuencia de hipocalcemia postoperatoria (Aspinall *et al* 2010). Los pacientes con bocio multinodular concomitante no son buenos candidatos para la cirugía mínimamente invasiva con radioguía pues existe una proporción muy elevada de zonas de captación falsamente positivas en el tiroides que podrían parecer adenomas paratiroideos (Mariani *et al* 2003).

La cervicoscopia requiere:

- ✓ la existencia de un diagnóstico clínico y bioquímico de certeza
- ✓ demostración de enfermedad en una sola glándula mediante un método de localización adecuado (gammagrafía con sestamibi Tecnecio 99)
- ✓ ausencia de enfermedad tiroidea demostrada por ecografía
- ✓ posibilidad de contar con método para medir los niveles intraoperatorios de PTH.

Debido a que la vida media de la PTH en sangre es muy corta (<5 minutos), una disminución de al menos el 50 % de su nivel en los primeros 5-10 minutos tras la resección del adenoma o glándula hiperplásica indica una eliminación eficaz de todo el tejido paratiroideo hiperfuncionante. Si los niveles de PTH descienden pero < 50 % se necesita ampliar la cirugía y completar la exploración del cuello buscando otras glándulas hiperplásicas o adenomatosas. En casos de enfermedad glandular múltiple se deben aplicar criterios más estrictos de curación (>70 % de la disminución de niveles de PTH) (Bilezikian *et al* 2002, Taniegra 2004).

En los pacientes en que se encuentra o sospecha una hiperplasia multiglandular se han recomendado distintos enfoques incluyendo la extirpación de todas o de aproximadamente 3 glándulas y media seguido de autotrasplante de fragmentos glandulares al antebrazo. Se debe hacer un esfuerzo para buscar una posible quinta glándula y cualquier tejido paratiroideo no resecado (o trasplantado).

La causa más frecuente de fracaso quirúrgico inicial -enfermedad preexistente- es la presencia de una hiperplasia paratiroidea no detectada (habitualmente asimétrica) o tejido paratiroideo ectópico: glándulas intratiroideas no descendidas, retroesofágicas o mediastínicas. La incidencia de la enfermedad recurrente, que se define como aquella que aparece después de un intervalo de por lo menos 6 a 12 meses de normocalcemia, varía del 2 al 16 %. En los pacientes que requieren reoperación por fracaso quirúrgico se debe intentar la localización preoperatoria de forma rutinaria y la determinación intraoperatoria de PTH pueden guiar al cirujano durante estos procedimientos habitualmente difíciles (Casanova 2005).

Las complicaciones más graves de la cirugía paratiroidea -parálisis de las cuerdas vocales e hipoparatiroidismo permanente- aparecen en menos del 1-4 % respectivamente de los procedimientos realizados por cirujanos con experiencia, aunque las tasas para estas complicaciones pueden ser mucho más elevadas cuando las realizan cirujanos con menos experiencia y en el caso de reoperaciones.

Después de la resección eficaz de un adenoma paratiroideo, los niveles de PTH sérica disminuyen muy rápido, habitualmente a concentraciones indetectables, con una vida media de desaparición de unos 2 minutos, mientras que el calcio sérico alcanza habitualmente un nadir entre las 24 y 36 horas. La PTH sérica vuelve a los valores normales a las 30 horas aunque las determinaciones de la respuesta paratiroidea secretora a la hipocalcemia sugieren que no se normaliza completamente hasta por lo menos después de

varias semanas (Taniegra 2004). En el momento en que se restablece la vía oral en el postoperatorio algunos grupos administran suplementos rutinarios de calcio oral pero otros solamente en aquellos pacientes con adenomas grandes e hiperparatiroidismo grave o en quienes tenían elevada la fosfatasa alcalina preoperatoriamente, a estos pacientes además se les añaden suplementos de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D a dosis moderadas (0,5 a 1 µg diario). Son pacientes en los que puede anticiparse un gran requerimiento de calcio, habitualmente después de varias semanas tras la operación en el momento en que mineralizan el hueso. Este síndrome llamado del “hueso hambriento” se asocia con hipocalcemia, hipofosfatemia y niveles urinarios bajos de excreción de calcio.

#### **4. 6. 2. Tratamiento médico o no quirúrgico del HPP**

Los pacientes que no cumplen los criterios indicados previamente pueden continuar con vigilancia periódica y tratamiento médico. No hay forma de predecir qué pacientes progresarán o no por lo que es esencial realizar monitorización periódica con calcio sérico y DMO en 3 proyecciones. La gran mayoría de los pacientes asintomáticos que no cumplen criterios quirúrgicos no los llegarán a presentar incluso hasta 15 años después del diagnóstico (Rubin *et al* 2008). Los datos sugieren que hay heterogeneidad clínica y que se precisa investigar en la variedad de fenotipos clínicos y su historia natural. El 3<sup>er</sup> Workshop recomienda una aproximación más quirúrgica aunque sigue habiendo un papel para el tratamiento conservador (Silverberg *et al* 2009). Los pacientes asintomáticos que no se someten a cirugía mantienen la DMO estable (Silverberg *et al* 1999) incluso hasta 15 años después del diagnóstico (Rubin *et al* 2008).

Se recomienda seguimiento de los pacientes en intervalos de 6 meses a 1 año para detectar la aparición de síntomas, aparición de efectos adversos en la presión arterial o el suero, o en la evolución de los niveles del calcio o creatinina y determinaciones seriadas de la densidad mineral ósea.

#### **4. 6. 2. 1. Recomendaciones generales**

Se les debe advertir que mantengan una hidratación adecuada, evitar diuréticos tiazídicos e inmovilización prolongada. La ingesta de calcio no debe exceder las dosis recomendadas diarias estándar de 1000-1200 mg/ día (Bilezikian *et al* 2005).

En pacientes con déficit de vitamina D debe corregirse cuidadosamente antes de tomar cualquier otra decisión en cuanto a manejo médico o quirúrgico según las recomendaciones del 3<sup>er</sup> Workshop (Eastell *et al* 2009) para mantener niveles por encima de 20 ng/mL. Si los pacientes tienen hipercalcemia e hipercalciuria, repleccionar los niveles de vitamina D de forma segura puede ser difícil. Suplementos de vitamina D a dosis fisiológicas (400-600 UI/ día) parecen seguras pero la concentración de calcio sérico debe ser vigilada con frecuencia pues podrían aumentar considerablemente.

Los pacientes que no se someterán a una paratiroidectomía deben ser vigilados periódicamente. Las concentraciones de calcio sérico deben ser valoradas cada 6 meses. La DMO en las tres localizaciones (cadera, columna lumbar y radio) debe ser medida anualmente aunque un meta-análisis reciente sugiere que es razonable monitorizar la DMO en pacientes con HPP pero hacerlo cada 1-2 años sería innecesario puesto que se necesitan varios años para que el descenso medio de la DMO sobrepase el menor cambio detectable (Sankaran *et al* 2010). Se debe medir la creatinina sérica y el aclaramiento de creatinina anualmente (Bilezikian *et al* 2002).



#### 4. 6. 2. 2. Tratamiento farmacológico

El tratamiento médico para las complicaciones esqueléticas de HPP incluye tratamiento antiresortivo como bifosfonatos, terapia hormonal sustitutiva (THS) y raloxifeno. La evidencia de ensayos randomizados con placebo de bifosfonatos y THS demuestra que estos agentes disminuyen la remodelación ósea e incrementan la DMO en HPP en un grado similar a sus efectos en pacientes eucalcémicos y a la respuesta a la paratiroidectomía en HPP aunque no hay estudios disponibles sobre sus efectos sobre el riesgo de fractura. Los bifosfonatos y la THS son opciones para aquellos individuos en los que la protección esquelética es la principal razón para la intervención siendo de elección los bifosfonatos por los efectos adversos de la THS. Ninguna de las terapias antiresortivas modifica el calcio sérico o la PTH en la terapia a largo plazo. El cinacalcet es un calcimimético que baja eficazmente el calcio sérico y los niveles de PTH en la terapia a largo plazo en HPP pero no altera la remodelación ósea o la DMO (Khan *et al* 2009).

**4. 6. 2. 2. 1. Estrógenos.** Los estrógenos han demostrado un efecto en mejoría de DMO de un 7,5 % en columna lumbar, un 7,4 % en cuello femoral y un 7 % en antebrazo tras 4 años de tratamiento, similar al descrito para la cirugía en HPP leve (Orr-Waker *et al* 2000, Sankaran *et al* 2010).

Los moduladores de los receptores selectivos de los estrógenos, como el tamoxifeno o el raloxifeno, pueden ser útiles en las mujeres postmenopáusicas con osteopenia debida a HPP pues han demostrado reducir el calcio sérico y los marcadores de remodelación ósea (Rubin *et al* 2003). El Raloxifeno en HPP sólo ha demostrado en un estudio randomizado pequeño en un tratamiento de 2 meses en mujeres postmenopáusicas reducción de los niveles de calcio sérico. Sobre los efectos en masa ósea sólo hay un estudio sobre 3

pacientes cuya reducción prequirúrgica en la DMO se detuvo al introducir tratamiento con raloxifeno (Zanchetta *et al* 2001, Khan *et al* 2009).

**4. 6. 2. 2. 2. Fosfato oral.** Se ha propuesto el tratamiento con fosfato oral en pacientes en quienes ha fracasado o han rechazado la cirugía y que presentan cálculos renales de calcio recurrentes y otros síntomas importantes. El fosfato en esta enfermedad actúa inhibiendo la síntesis renal de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  y la resorción osteoclástica de hueso, promoviendo la precipitación de calcio en el hueso y en los tejidos blandos, y uniéndose al calcio intraluminal en el intestino e impidiendo su absorción. El fosfato oral reduce el calcio sérico y urinario así como la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  sérica pero aumenta la PTH sérica y se desconoce su efecto a largo plazo en el hueso.

**4. 6. 2. 2. 3. Bifosfonatos.** Los bifosfonatos se han utilizado con éxito en el tratamiento urgente de la hipercalcemia debida al HPP. Se ha demostrado ganancia de densidad mineral ósea con una magnitud de efecto similar al de la cirugía en HPP leve (Sankaran *et al* 2010) pero no queda claro si reducen el riesgo de fractura o no. Se pueden administrar a pacientes que no quieren o no pueden someterse a cirugía aunque cumplan criterios quirúrgicos pero no hay razón alguna para su uso en pacientes que no cumplen dichos criterios. El clodronato administrado por vía oral redujo (efecto no sostenido) los niveles de calcio sérico y de los marcadores de remodelación ósea sin modificar los niveles de PTH. El etidronato no demostró cambios en calcio sérico. El pamidronato administrado vía endovenosa fue eficaz transitoriamente en reducir los niveles de calcio sérico. El risedronato administrado vía oral en dosis elevadas durante 7 días cada 3 semanas redujo los niveles de calcio sérico con aumento de PTH. No hay datos a largo plazo. El alendronato es el más

evaluado hasta el momento y disminuye la remodelación ósea y aumenta DMO en cadera y columna lumbar siendo variable su efecto sobre el calcio sérico (Khan *et al* 2009).

**4. 6. 2. 2. 4. Calcimiméticos.** Son capaces de unir y activar el receptor paratiroideo sensible al calcio e inhiben la secreción de PTH aunque el calcio sérico esté elevado. En un ensayo clínico aleatorizado doble ciego se observó normalización rápida (en pocas semanas) de los niveles de calcio sérico en un 73 % de los pacientes con HPP leve a moderado tratados con cinacalcet que se mantuvo durante 52 semanas y no se objetivó ninguna mejoría en la DMO (Peacock *et al* 2005). En una ampliación de este estudio (Peacock *et al* 2009) a 4,5 años se mantuvo la mejoría lograda en los niveles de calcio sérico y en los niveles de PTH (estos últimos especialmente en los últimos dos años de seguimiento). La normalización de los niveles de calcio se ha comunicado recientemente sin relación con la gravedad del HPP, sintomático o asintomático, con cualquier nivel de calcio inicial (Peacock *et al* 2011).

#### **4. 6. 2. 3. Inyección percutánea de alcohol**

Está indicada en pacientes que cumplen criterios quirúrgicos pero cuyo estado general no hace recomendable realizar una cirugía reglada o en casos en que el paciente la rechaza. La técnica se realiza de forma ambulatoria y consiste en una inyección de etanol guiada en tiempo real con ecografía. La eficacia de estas técnicas varía en los casos comunicados. Parece que si no se consigue una necrosis completa de la glándula se posibilita la supervivencia y re- crecimiento de las células secretoras (Takami *et al* 2003). En 2008 un grupo italiano describió una técnica modificada en la cual intentan crear una pared fibrosa alrededor del adenoma con varias inyecciones de etanol alrededor del adenoma para

evitar la propagación de una inyección sucesiva con mayor cantidad de alcohol (Capelli *et al* 2008).

#### **4. 6. 2. 4. Ultrasonidos de alta intensidad**

Recientemente se ha realizado un estudio piloto con esta técnica que utiliza ultrasonidos de alta intensidad aplicados localmente en 4 pacientes con HPP. Esta técnica ablativa se basa en la generación de ondas de ultrasonidos que se propagan a través de la piel hasta llegar a un punto específico donde la temperatura incrementa y se produce necrosis coagulativa sin afectar a los tejidos adyacentes. La eficacia en cuanto a niveles de calcio y PTH fue satisfactoria (Kovatcheva *et al* 2010).

## 5. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP) DE LOS GENES A ESTUDIAR Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO ÓSEO

### 5.1. Introducción.

En los últimos años se ha estudiado una serie de genes que parecen intervenir en el metabolismo fosfo-cálcico, en la remodelación ósea y en los procesos fisiopatológicos asociados. Estos genes han sido elegidos bien por ser considerados candidatos por su relación con la fisiopatología del metabolismo óseo o bien por haber demostrado tener relación con el metabolismo óseo en estudios de Genome Wide Association (GWA). Hay genes que pueden formar parte de ambos grupos.

Los genes candidatos estudiados más relevantes son los siguientes: gen del receptor de la Vitamina D (*VDR*) (Wynne et al 2002), gen del receptor sensor del Calcio (*CaSR*) (Kapur et al 2010), gen del receptor de estrógenos (*ESR1*) (Choi et al 2005, Paternoster et al 2010), gen del colágeno tipo 1 $\alpha$ -1 (*COL1A1*) (Wynne et al 2002), genes de proteínas relacionadas con la vía Wnt como el gen de la esclerostina (*Sost*) (Paternoster et al 2010), gen de la proteína relacionada con la lipoproteína de baja densidad 5 (*LRP5*) (Paternoster et al 2010) y finalmente genes del sistema de citocinas OPG/RANKL: *OPG*, *RANK* y *RANKL* que se detallarán específicamente más adelante. La mayoría de estudios genéticos sobre SNPs en este sistema se basan en la evaluación de su relación con la masa ósea principalmente en mujeres postmenopáusicas. Este mismo sistema también ha sido estudiado en relación con otros procesos como son la enfermedad arterial coronaria y calcificación aórtica (Rhee et al 2006), presión arterial (Golledge et al 2009), periodontitis (Soedarsono et al 2006), enfermedad de Paget ósea (Daroszewska et al 2004) o fallo en

artroplastia de cadera (Malik *et al* 2006). En cuanto al *GNAS1*, lo consideramos gen candidato pues codifica la subunidad G<sub>s</sub>α del receptor PTH/PTHrp.

Sin embargo, a pesar del gran número de genes susceptibles de estudio dentro del ámbito del metabolismo mineral óseo, hasta la fecha no hay ningún estudio genético sobre SNPs realizado en pacientes con HPP.

Los genes evaluados en estudios de GWA son el gen del receptor de estrógenos (*ESR1*) (Styrkarsdottir *et al* 2008), el gen del complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) (Styrkarsdottir *et al* 2008), el gen de la osteoprotegerina (*OPG*) y el gen del receptor activador del factor nuclear-κB (*RANK*) (Richards *et al* 2008, Styrkarsdottir *et al* 2008) además del gen del ligando del receptor activador del factor nuclear-κB (*RANKL*) (Styrkarsdottir *et al* 2008, Paternoster *et al* 2010). Otro gen identificado mediante estudios de GWA en los que se intentaba identificar *loci* relacionados con litiasis renal es el *CLDN14* localizado en 21q22 que codifica la proteína Claudina 14, miembro de la familia de las “claudinas” que regulan el paso paracelular de iones y solutos pequeños en las uniones epiteliales estrechas (Thorleifsson *et al* 2009). Estas uniones son el tipo de contacto más apical célula a célula entre células polarizadas en la membrana lateral existentes en los endotelios y epitelios. Los mamíferos expresan aproximadamente 24 claudinas. La distribución y función específicas de las diferentes claudinas es un determinante de las propiedades y selectividad del transporte paracelular de los diferentes epitelios (Angelow *et al* 2008). La proteína claudina 14 consta de 4 dominios transmembrana y se expresa en riñón en el asa de Henle y en el túbulo contorneado proximal y también en el epitelio de otros órganos. Se cree que la combinación particular de claudinas condiciona las propiedades paracelulares únicas de cada segmento de la nefrona. En cultivos celulares de osteoblastos de tibia o fémur de rata se ha demostrado expresión de varias claudinas (5, 11, 14, 15 y 16) mediante análisis de western blot e inmunofluorescencia confocal (Wongdee *et al* 2008).

## 5.2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los SNP o polimorfismos de un solo nucleótido son variantes alélicas comunes de un gen asociadas, no siempre, con diferencias en la función de las proteínas codificadas por los mismos. Las variaciones en la secuencia en ocasiones carecerán de repercusión funcional (“polimorfismos silentes”) mientras que en otras ocasiones sí tendrán como consecuencia un cambio en la proteína con repercusión funcional (“polimorfismos funcionales”). Estos últimos pueden consistir en variaciones en la región codificante que supongan un cambio en la secuencia de aminoácidos, variaciones en la región promotora 5’ que se asocien a diferencias en la transcripción del ARN o variaciones en la región 3’ que determinen diferencias en la degradación del ARN mensajero. Dado que los polimorfismos pueden suponer diferencias en la bio-actividad de la proteína codificada, es de esperar que la asociación de un determinado alelo con un fenotipo se mantenga en las diferentes poblaciones estudiadas. Como promedio, por cada 500 nucleótidos de un gen uno es polimórfico. La cuestión fundamental en la investigación actual es valorar la repercusión funcional de dichas variaciones (Uitterlinden *et al* 2004).

## 5.3. SNP de los genes del sistema de citocinas OPG/RANKL y su relación con la DMO

Como ya se ha comentado previamente, en los últimos años se ha identificado un sistema de citocinas esencial en la osteoclastogénesis y en la activación de los osteoclastos: el sistema OPG-RANKL y su receptor, el RANK. Varios estudios simples y de GWA han

evaluado la relación entre numerosos genes y su posible relación con DMO, fracturas osteoporóticas y otras enfermedades del metabolismo mineral estableciendo que el gen de *OPG* tiene influencia sobre DMO y fracturas en cadera y columna lumbar y que el gen de *RANK* se asocia con fracturas pero no con DMO (Richards *et al* 2008, Stykarsdottir *et al* 2008). El locus del gen *RANKL* también ha demostrado influir en la DMO en cadera y columna lumbar (Stykarsdottir *et al* 2008).

En relación con la densidad mineral ósea se han publicado varios trabajos en los que se analiza la importancia de ciertos polimorfismos relacionados con el locus del gen *OPG* (Figura 5) y con el gen *RANKL* y su relación con masa ósea o fracturas, incluyendo un reciente metanálisis (Paternoster *et al* 2010), pero no hay estudios que analicen dichos SNPs en el HPP.

### 5. 3. 1. Estudio del SNP 1181 G/C del gen *OPG* (rs2073618).

Diferentes autores en el estudio del SNP 1181 G/C del gen *OPG* encuentran niveles de densidad mineral ósea significativamente inferiores en relación con el alelo G o lo que es lo mismo: parece que la presencia del alelo C actúa como un factor protector de la DMO.

- Arko *et al* en 2005 estudió 136 mujeres postmenopáusicas eslovenas encontrando mayor DMO en columna lumbar medida por DXA en las mujeres homocigotas para el alelo C. No encontró diferencias entre los distintos grupos alélicos y la DMO en cadera.
- Zhao *et al* en 2005 estudió a 205 mujeres postmenopáusicas chinas de entre 49 y 75 años y encontró niveles de DMO mayores en aquellas homocigotas para el alelo C en columna lumbar medida por DXA. Las mujeres con el genotipo GG tenían un



riesgo un 2,7 mayor de osteopenia/osteoporosis que quienes portaban el genotipo CC.

- En esta línea, nuestro grupo de investigación (García-Unzueta *et al* 2007) muestra que dicho polimorfismo es un factor independiente determinante de la DMO (medida por DXA en columna lumbar y cadera) en 69 mujeres premenopáusicas y una tendencia en el mismo sentido en 263 mujeres postmenopáusicas.
- Kim *et al* en 2007 estudió 385 mujeres postmenopáusicas coreanas observando una mayor DMO en columna lumbar medida por DXA en las mujeres portadoras del alelo C con efecto dosis: mayor DMO en las homocigotas CC que en las heterocigotas y mayor DMO a su vez en las heterocigotas respecto de las homocigotas GG. Esta asociación no se demostró en relación con la DMO en cadera medida por DXA.
- Moffett *et al* en 2008 observó en 6.695 mujeres estadounidenses de al menos 65 años de edad que las homocigotas para el alelo G tenían menor DMO medida por DXA en intertrocánter, radio distal, columna lumbar y calcáneo que las portadoras del alelo C. Sin embargo, el genotipo CC confería un riesgo de fracturas de cadera un 51 % mayor que el genotipo GG que no se explica por las diferencias en la DMO que van en sentido opuesto.
- Ueland *et al* en 2007 no encontró ninguna asociación entre este polimorfismo y la frecuencia de fracturas o la DMO medida por DXA en cadera o por ultrasonidos en tobillo en 1333 mujeres postmenopáusicas australianas.
- Dong *et al* en 2009 estudiando 680 hombres y 1.039 mujeres estadounidenses con edad media de alrededor de 47 años no encontró ninguna asociación entre este polimorfismo y la DMO en cadera medida por DXA o un índice de resistencia a la compresión en cuello femoral calculado a partir de la DMO y de parámetros antropométricos.

- Jurado *et al* en 2010 en 900 mujeres postmenopáusicas españolas no encontró asociación entre este polimorfismo y fracturas o DMO en columna lumbar medida por DXA.
- De manera discordante y aislada Wynne *et al* en 2002, encontró que la presencia de uno o mas alelos C en posición 1181 en 381 mujeres irlandesas postmenopausicas se asociaba de forma no significativa con menor DMO medida por DXA en columna lumbar y cadera.

### 5. 3. 2. Estudio del SNP 163 A/G del gen *OPG* (rs3102735).

Varios autores han demostrado la relación entre el alelo menor de este polimorfismo (G) y menor DMO o mayor frecuencia de fracturas:

- Langhdahl *et al* en 2002 estudió 472 mujeres danesas con y sin osteoporosis con edades medias de  $64,2 \pm 9,2$  y  $57,8 \pm 15,2$  respectivamente y 123 varones daneses con y sin osteoporosis (edades medias de  $56,0 \pm 13,6$  y  $51,2 \pm 15,9$  respectivamente) encontrando relación entre fracturas vertebrales y baja DMO medida por DXA en relación con el alelo G en cadera y columna lumbar.
- Jorgensen *et al* en 2004 en 107 mujeres danesas de más de 65 años encontró mayor prevalencia del alelo G en las pacientes con fracturas de cadera y muñeca así como niveles bajos de DMO medida por ultrasonidos en tobillo y por DXA antebrazo en las mujeres con el alelo G.
- Hsu *et al* en 2006 en 575 varones chinos con edad media de 48 años objetivó que el genotipo GG se asociaba con mayor densidad mineral ósea corporal total y con un

menor riesgo de presentar muy baja DMO en cadera medida por DXA. No se encontró esta asociación en las mujeres pre y postmenopáusicas estudiadas.

- Takács *et al* en 2010 en 360 mujeres húngaras postmenopáusicas encontró menor DMO en cadera medida por DXA en relación con el alelo G. No se encontró asociación entre fracturas y las variaciones alélicas.
- Choi *et al* en 2005 no encontró ninguna relación entre este polimorfismo y la DMO en calcáneo medida por DXA en 650 mujeres coreanas postmenopáusicas.
- García-Unzueta *et al* en 2007 en su estudio en 69 mujeres sanas premenopáusicas y 236 postmenopáusicas no encontró ninguna asociación entre este polimorfismo y la DMO en columna lumbar o cadera medida por DXA.
- Tampoco Ueland *et al* en 2007 no encontró ninguna asociación entre este polimorfismo y frecuencia de fracturas o la DMO medida por DXA en cadera o por ultrasonidos en tobillo en 1.333 mujeres postmenopáusicas australianas.

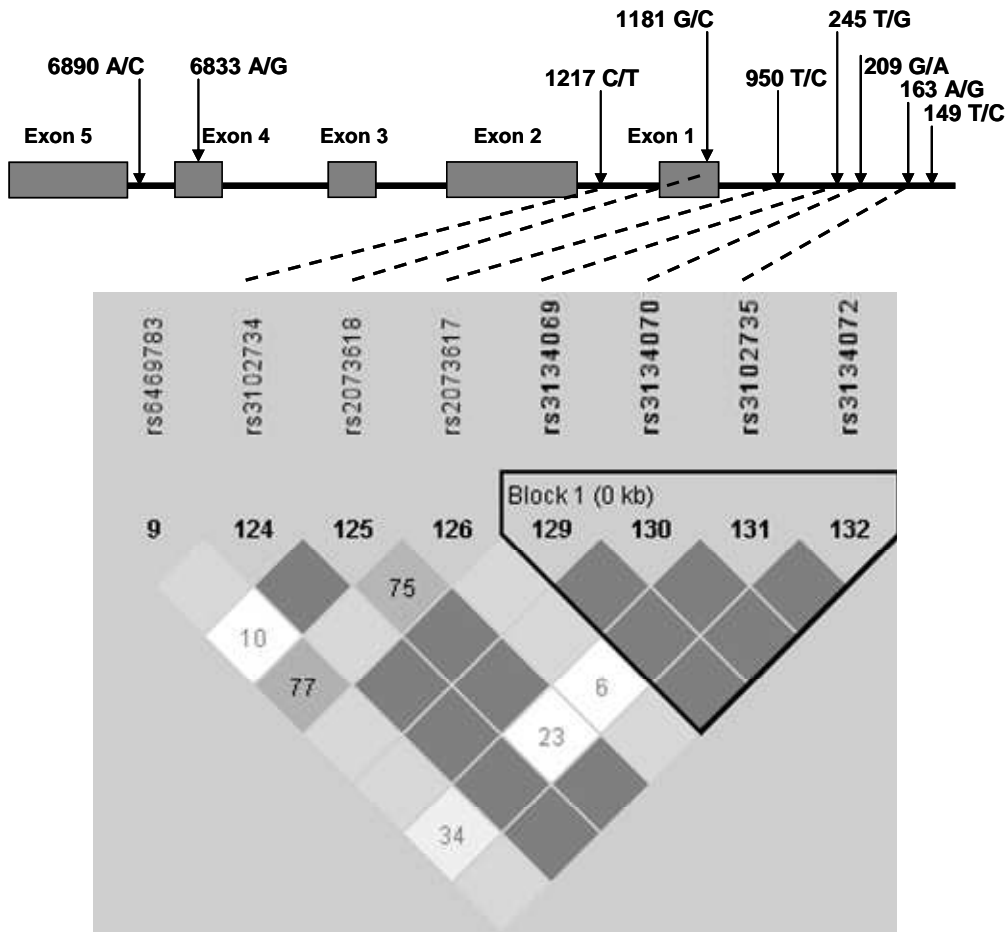
### 5. 3. 3. Estudio del SNP 245 T/G del gen *OPG* (rs3134070).

- Langhdahl *et al* en 2002 estudió 472 mujeres danesas con y sin osteoporosis con edades medias de  $64,2 \pm 9,2$  y  $57,8 \pm 15,2$  respectivamente y 123 varones daneses con y sin osteoporosis (edades medias de  $56,0 \pm 13,6$  y  $51,2 \pm 15,9$  respectivamente) y encontró relación entre el alelo G y mayor frecuencia de fracturas vertebrales. Además, el alelo G se encontraba con mayor frecuencia en los pacientes osteoporóticos.
- Yamada *et al* en 2003 encontró menor DMO en radio medida por tomografía computerizada cuantitativa periférica, de cuerpo total y cadera medida por DXA en 1.094 mujeres postmenopáusicas japonesas con el genotipo GG respecto de las

portadoras de los genotipos TG o TT. En el estudio sobre varones (n=1.125) no se demostró esta misma asociación.

- Arko *et al* en 2005 no encontró asociación entre este SNP y la DMO medida por DXA en columna lumbar o cadera en 136 mujeres postmenopáusicas eslovenas.
- Kim *et al* en 2007 y Jurado *et al* 2010 no encontraron asociación entre este SNP de la OPG y DMO medida por DXA en columna lumbar o en cadera en 385 mujeres postmenopáusicas coreanas y 900 españolas respectivamente.

**Figura 5. Polimorfismos en la region proximal del gen *OPG*.** Los SNP 245 T/G (rs3134070) y 163 A/G (rs3102735) parecen estar en el mismo bloque haplotípico (promotor) pero en uno diferente del que contiene al SNP 1181 G/C (exón 1).



### 5. 3. 4. Estudio de SNPs del gen *RANK*.

Respecto al gen *RANK* y su relación con la densidad mineral ósea, en la literatura aparecen estudiados únicamente dos polimorfismos, el Ala-192-Val, que supone un cambio de una Alanina por una Valina en la proteína, estudiado por Hsu (Hsu *et al* 2006), y que puso de manifiesto que los varones con genotipo TC presentaban una mayor densidad mineral ósea total y el 575 TC estudiado por Choi (Choi *et al* 2005) en 650 mujeres coreanas postmenopáusicas demostrando que aquéllas que portaban el alelo T tenían mayor densidad mineral ósea en calcáneo medido por DXA aunque la diferencia respecto a los que no lo portaban era muy pequeña. La presencia de alelo T, referente a este último polimorfismo de *RANK* también ha sido relacionada recientemente con fallo aséptico de artroplastia total de cadera por Malik (Malik *et al* 2006).

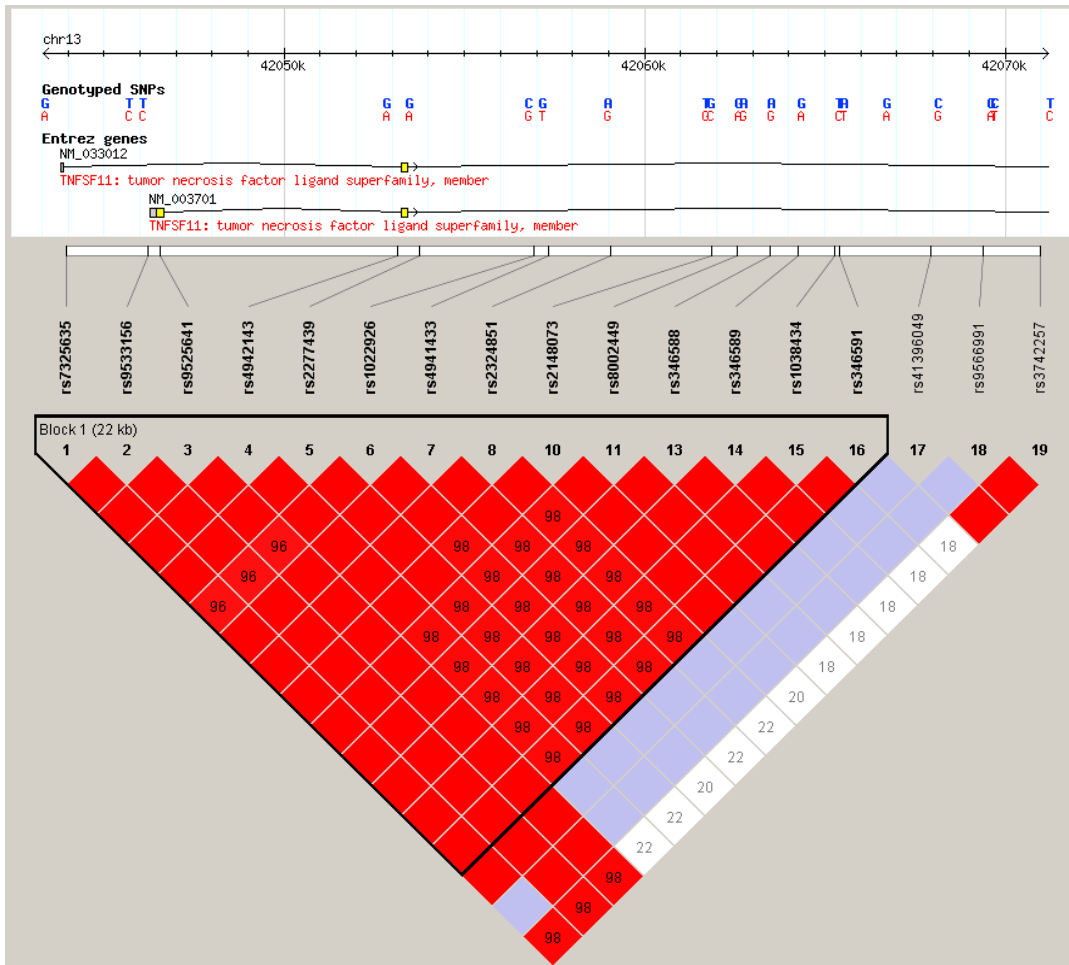
### 5. 3. 5. Estudio de SNPs del gen *RANKL*.

En cuanto al gen *RANKL* (Figura 6) y la densidad mineral ósea, algunos estudios preliminares han analizado la asociación de SNP en este gen (rs9594782 y rs2277438) con la DMO.

- Hsu *et al* en 2006 objetivó en 575 varones chinos con edad media de 48 años al estudiar el SNP rs9594782 que los sujetos con presencia del alelo C (TC o CC) tenían 2,1 veces mayor riesgo de tener DMO muy baja medida por DXA en cadera que los sujetos con genotipo TT. El otro polimorfismo estudiado, el rs2277438, no presentó ninguna asociación significativa con la DMO.
- Kim *et al* en 2007 estudió 385 mujeres postmenopáusicas coreanas sin encontrar relación entre el SNP rs2277438 y la DMO en columna lumbar o cadera medida por DXA.

- Dong *et al* en 2009 estudiando 680 hombres y 1.039 mujeres estadounidenses con edad media de alrededor de 47 años encontró que el haplotipo GG del SNP rs2277438 del gen *RANKL* se relacionaba con un mayor índice de resistencia a la compresión en cuello femoral calculado a partir de la DMO medida por DXA y de parámetros antropométricos.

Figura 6. Estructura haplotípica del gen *RANKL* según datos de Hap Map





#### 5. 4. Estudio del SNP 393 T/C del gen *GNAS1* (rs7121).

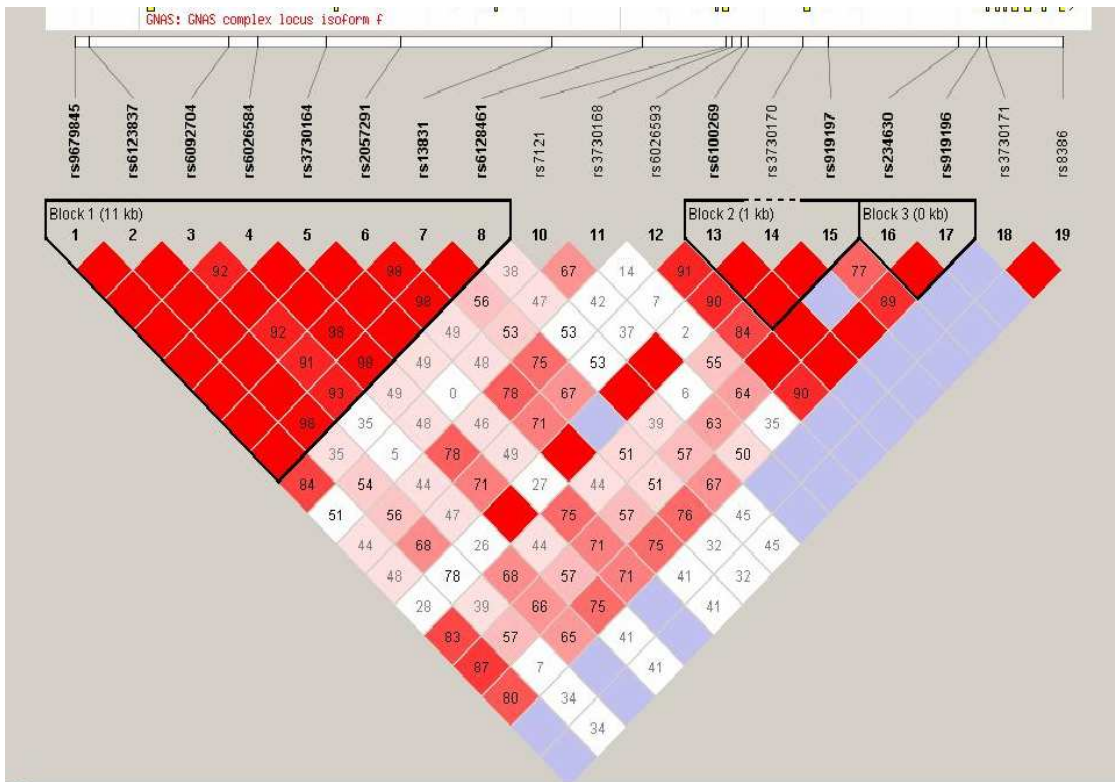
El gen *GNAS1* (figura 7) ha sido estudiado fundamentalmente en relación con el pseudohipoparatiroidismo (SHP), la resistencia que confiere a la PTH y su herencia (Bastepe *et al* 2001, Lalande 2001, Freson *et al* 2002, Linglart *et al* 2002, De Sanctis *et al* 2003).

Más concretamente, parece que el SNP 393T/C del gen *GNAS1* ha demostrado influir en el plegamiento del RNA mensajero teniendo impacto sobre su estabilidad y expresión subsiguiente de la subunidad  $G_s\alpha$ . El SNP 393T/C podría actuar bajo ciertas circunstancias patológicas como un modulador de la señal de transducción a través de receptores transmembrana.

Este SNP ha sido estudiado en pacientes con migraña con la base fisiopatológica de que las proteínas G es el sistema de transducción de la mayoría de los receptores catecolaminérgicos y de dolor. Las proteínas G conforman una familia de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y  $\beta$ - $\gamma$  forman un dímero funcional. Al activarse los receptores de membrana, la subunidad  $\alpha$  libera difosfato de guanosina y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ - $\gamma$  se disocian y pueden modular una gran cantidad de dianas como los canales de iones, isoformas de fosfolipasa C e isoformas de adenilciclase. Parece que en los pacientes con diferentes tipos de cefalea la inhibición de la producción de AMPc mediada por proteínas G inhibitoras es menor lo que sugiere un menor tono inhibitorio que podría predisponer a una hiperexcitabilidad neuronal. Los receptores  $\beta$  adrenérgicos acoplados a proteínas G estimulan a la adenil ciclase en el músculo cardíaco y vascular. Los pacientes con migraña presentan niveles basales entre episodios de AMPc plasmáticos cuatro veces mayores que los sujetos control o que pacientes con otras enfermedades que cursan con dolor crónico. En el estudio del SNP 393T/C el alelo C es más frecuente en los pacientes con migraña que en los sujetos control y que el genotipo CC prácticamente dobla el riesgo de padecer migraña respecto de los genotipos TT o TC (Oterino *et al* 2007).

El SNP 393 T/C también ha sido estudiado en relación al resultado clínico de pacientes que padecen diferentes tipos de carcinomas. En pacientes afectados de colangiocarcinoma los homocigotos TT presentan una mayor tasa de proliferación celular y menor de apoptosis (Schmitz *et al* 2007) mientras que en tumor de vejiga, carcinoma renal de células claras y en leucemia crónica linfocítica este mismo genotipo confiere un evolución más favorable (Frey *et al* 2005, Frey *et al* 2006). En pacientes con hipertiroidismo por Enfermedad de Graves-Basedow, los homocigotos TT tenían un mayor riesgo de recaída (Glowacka *et al* 2009). Hasta la fecha, este SNP no ha sido estudiado en relación con masa ósea o fracturas en sujetos con hiperparatiroidismo primario o en sujetos control.

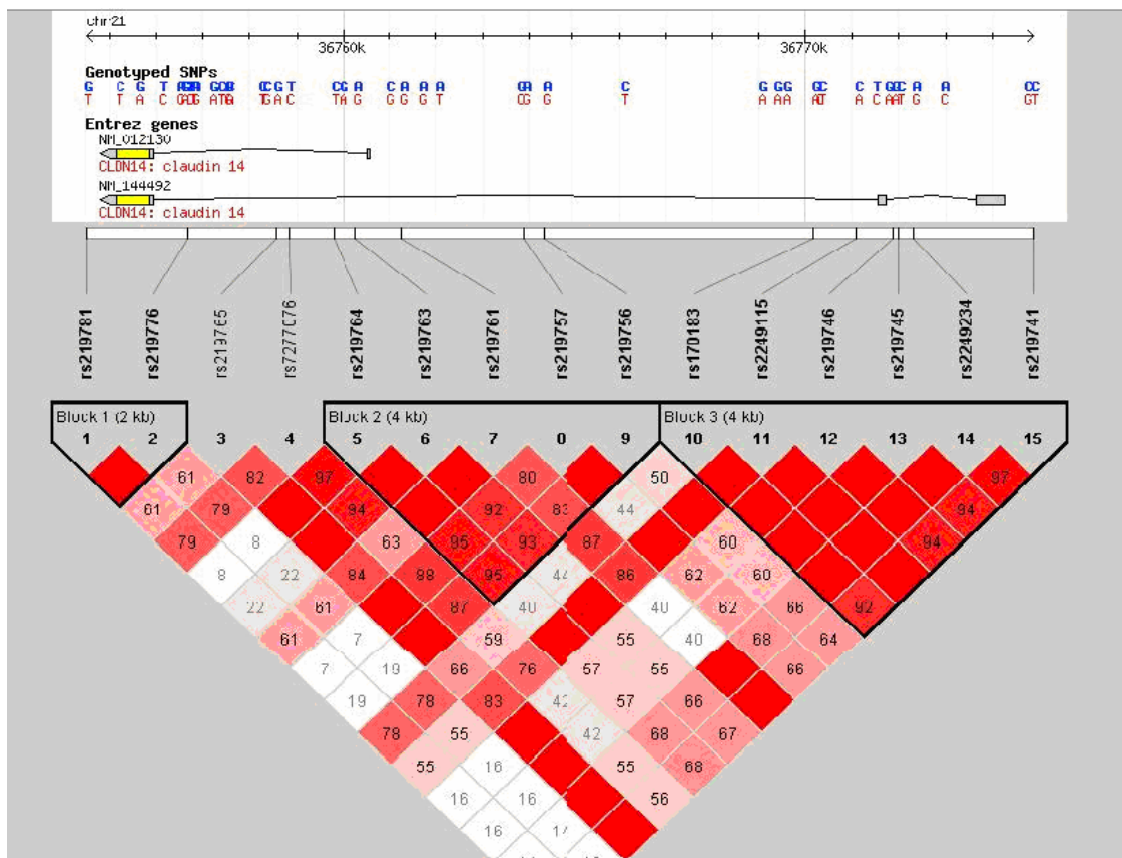
Figura 7. Estructura haplotípica del gen *GNAS1* según datos de Hap Map



### 5. 5. Estudio del SNP rs219780 del gen *CLDN14*.

Recientemente se ha investigado la asociación del SNP rs219780 del gen *CLDN14* con la DMO. Este SNP se encuentra localizado junto al último exón de este gen (Figura 8). El estudio mencionado ha relacionado el SNP rs219780 del gen *CLDN14* y la DMO en población de más de 11.000 individuos procedentes de Islandia y Países Bajos encontrando que el alelo C confiere un riesgo de presentar niveles más elevados de PTH y más bajos de DMO en cadera y columna lumbar en mujeres. En los individuos que padecían de litiasis renal este efecto sobre la DMO fue mayor en cadera y fue menor sobre la columna lumbar (Thorleifsson *et al* 2009). Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios de análisis genotípico del gen *CLDN14* en HPP.

Figura 8. Estructura haplotípica del gen *CLDN14* según datos de Hap Map



## iii. Objetivos

## 1. OBJETIVO GENERAL

Pretendemos estudiar diversos aspectos de la genética relacionados con el metabolismo óseo en pacientes con hiperparatiroidismo primario, una enfermedad frecuente que afecta al metabolismo del hueso produciendo un aumento de la remodelación ósea como parte de su espectro de manifestaciones clínicas.

Nuestra hipótesis es que la presencia de diferentes polimorfismos en los genes *OPG*, *RANK* y *RANKL* así como de *GNAS1* y *CLDN14* podría modular la respuesta del hueso en el HPP. En este sentido es posible que determinados polimorfismos de estos genes se relacionen con la masa ósea en el HPP e incluso induzcan diferentes respuestas de los marcadores y citocinas relacionadas con la fisiología del hueso, lo que se traduciría en diferentes manifestaciones clínicas y variación en la respuesta ósea (pérdida o mantenimiento de masa ósea).

Por ello, nuestro objetivo general es analizar la presencia de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificadores de proteínas implicadas en la regulación de la remodelación ósea como son *OPG*, *RANK*, *RANKL*, *GNAS1* y *CLDN14* en relación con las manifestaciones clínicas, bioquímicas y densitométricas en estos pacientes.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analizar las características demográficas y antropométricas de los pacientes con HPP en el momento del diagnóstico en los que se han excluido otras causas de afectación del metabolismo óseo

b) Analizar la clínica predominante en el momento del diagnóstico del HPP

c) Analizar la presencia de manifestaciones litiásicas renales en el momento del diagnóstico

d) Analizar el grado de afectación ósea en el momento del diagnóstico mediante valoración de la densidad mineral ósea por DXA en cadera total y cuello femoral, columna lumbar y radio distal

e) Analizar los parámetros bioquímicos en el momento del diagnóstico: calcio sérico, calcio iónico, PTHi, 25-OH Vitamina D, calciuria en 24h

f) Analizar el estado de los marcadores séricos de remodelación ósea en el momento del diagnóstico: fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina ósea, P1NP, osteocalcina y  $\beta$  crosslaps

g) Analizar la distribución de tres polimorfismos del gen *OPG* (163 A/G (rs3102735), 245 T/G (rs3134070), 1181 G/C (rs2073618) y de los polimorfismos más relacionados con el metabolismo óseo de los genes *RANK* (ala192val) (rs1805034), *RANKL* (rs9594782), *GNAS1* 393 T/C (rs7121) y *CLDN14* (rs219780) y su correlación con fracturas óseas, litiasis renal, parámetros bioquímicos, marcadores de remodelación ósea y densidad mineral ósea.

## iv. Material y métodos



## **1. SELECCIÓN DE PACIENTES, RECOGIDA DE DATOS Y TOMA DE MUESTRAS**

Se trata de un estudio transversal, y retrospectivo en el caso de los pacientes que acceden al estudio una vez operados.

### **1. 1. Selección de pacientes**

Los pacientes fueron reclutados a partir de cualquier caso de hiperparatiroidismo primario identificado hubiera sido tratado en nuestro hospital o no. Los casos se definieron como hipercalcemia junto con niveles altos o inapropiadamente normales de PTH. También se incluyeron los casos de hiperparatiroidismo primario normocalcémico (niveles normales de calcio y niveles elevados de PTH sin otra patología subyacente) que en algún momento han tenido hipercalcemia.

La principal fuente de identificación de casos de hiperparatiroidismo primario tratado quirúrgicamente fue el sistema de codificación del hospital. Nuestro laboratorio realizaba todas las determinaciones de PTH de la Comunidad Autónoma de Cantabria en el período en que se realizó en estudio y cada nivel elevado de PTH detectado conllevó el estudio del caso concreto para confirmar o descartar el diagnóstico de hiperparatiroidismo primario.

Con la intención de valorar la distribución alélica de los genes a estudio en la población general se reclutaron 328 voluntarios sanos de entre los trabajadores del hospital, miembros de asociaciones cívicas, grupos religiosos y residencias geriátricas.

La población de estudio de base tiene un origen caucásico y residía en la Comunidad Autónoma de Cantabria. Se solicitó consentimiento informado a todos los participantes (Anexo 1: hoja de consentimiento informado).

- Criterios de inclusión

- Ser mayor de 18 años y haber aceptado el consentimiento informado proporcionado antes de entrar al estudio
- Cumplir los criterios diagnósticos correspondientes a hiperparatiroidismo primario: hipercalcemia en presencia de PTH anormalmente elevada excluyendo hipercalcemia hipocalciúrica familiar

- Criterios de exclusión

- Pacientes que no presten su consentimiento informado
- Pacientes cuyo origen fuera distinto al español
- Pacientes con enfermedades que afectan a la homeostasis del hueso
- Pacientes con insuficiencia renal
- Pacientes con infecciones o procesos inflamatorios agudos al menos un mes antes de las determinaciones
- Pacientes tratados con medicamentos que puedan interferir con las variables del estudio: bifosfonatos, ranelato de estroncio, corticoides, anti-epilépticos, estrógenos, tiazidas o terapia hormonal sustitutiva en mujeres más allá de los 55 años de edad

## 1. 2. Recogida de datos

Mediante revisión de historia clínica o entrevista estructurada a efecto de recoger las siguientes variables (Anexo 2: formulario de recogida de datos):

- Edad, peso y talla
- TAS y TAD: media aritmética de dos determinaciones
- Antecedentes de interés:
  - o especialmente los que afecten a los criterios de exclusión
  - o fracturas: se consideraron fracturas a efectos del estudio toda fractura traumática o espontánea en cualquier localización ósea excepto nariz, dedos, manos, cráneo y mandíbula
  - o litiasis: fue definida como cualquier cólico renal de origen litiasico o litiasis, sintomática o no, detectada mediante cualquier exploración radiológica
- Tratamientos previos
- Tratamiento farmacológico actual

### 1.3. Toma de muestras

Una vez incluidos en el estudio, a los sujetos control y a los pacientes con hiperparatiroidismo primario de reciente diagnóstico se les realizó una toma basal de sangre (tubos específicos para la extracción de ADN (1 tubo de 5 mL con EDTA como anticoagulante) y obtención de suero (2 tubos de 10 mL de sangre sin anticoagulante) en ayunas entre las 08:00 y las 09:00 horas, y posteriormente se les citó en la Unidad de Densitometría para su evaluación.

En el caso de los pacientes cuyo hiperparatiroidismo primario fuera diagnosticado previamente al inicio del estudio también se les realizó una toma de sangre para extracción de ADN y se recogieron los resultados de los parámetros bioquímicos extraídos en el momento del diagnóstico.

## 2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y METODOLOGÍA

Todas las muestras se procesaron de manera inmediata, en cualquier caso en menos de 1 hora desde el momento de la recogida. Los tubos para suero se dejaron coagular durante 20-30 minutos y posteriormente se centrifugó a 2000 g a temperatura ambiente. El suero destinado a las determinaciones rutinarias se reservó almacenado a 4 °C hasta ser procesado (siempre el mismo día de la extracción). El resto del suero (determinaciones específicas) se repartió en tubos Eppendorf debidamente identificados y se congeló a -80 °C hasta ser procesado.

## 2. 1. Determinaciones analíticas generales

En todas las muestras se realizaron las siguientes determinaciones:

I. Las determinaciones de glucosa, calcio total, fósforo, albúmina, fosfatasa alcalina total y creatinina se realizaron en suero mediante análisis automatizado en un ADVIA 2400 Chemistry System (SIEMENS®) usando reactivos suministrados por SIEMENS® y según las reacciones específicas. Los niveles de calcio total fueron corregidos por la albúmina.

- **Calcio Total:** Espectrofotometría automatizada: método del complejo de la  $\theta$ -cresolftaleína; reactivos suministrados por SIEMENS®
- **Fósforo:** Espectrofotometría automatizada: método del complejo del molibdato amónico; reactivos suministrados por SIEMENS®
- **Albúmina:** Espectrofotometría automatizada: método del verde de Bromocresol; reactivos suministrados por SIEMENS®
- **Creatinina:** Espectrofotometría automatizada: método del ácido pícrico; reactivos suministrados por SIEMENS®
- **Fosfatasa Alcalina Total:** Espectrofotometría automatizada: de la actividad del enzima sobre el sustrato 4-nitrofenil-fosfato 4NPP; reactivos suministrados por SIEMENS®

II. **Calcio iónico.** Se determinó mediante electroquímica utilizando un autoanalizador por electrodo selectivo Ciba-Corning 634, Corning Diag. Corp, Medfield, Massachusetts, USA). Valores normales: 1,16-1,30 mM.

## 2. 2. Determinaciones analíticas específicas

**I. PTH intacta.** Se determinó mediante ensayo inmunológico específico por quimioluminiscencia (Liason, DiaSorin S.p.A., Vercelly, Italy) utilizando 2 anticuerpos monoclonales específicos: uno contra el fragmento 39-84 y otro contra el fragmento aminoterminal 1-34. Este ensayo reconoce la PTH intacta 1-84, pero tiene reacción cruzada con el fragmento 7-84 de reciente identificación y de significado clínico desconocido. Sensibilidad: 1 pg/mL. La reproductibilidad intra e interensayo es de 2,6 y 5,8 % respectivamente. Valores normales <65 pg/mL.

**II. 25-OH-vitamina D.** La determinación de los niveles de 25-OH-vitamina D se realizó mediante RIA previa extracción del metabolito con acetonitrilo en columna (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, USA). Sensibilidad funcional: 4 ng/mL. La reproductibilidad intra e interensayo es de 9,4 y 10,8 % respectivamente. Valores normales 25-60 ng/mL. Esta técnica presenta reacción cruzada del 100 % con la 25-OH-D<sub>2</sub> y 25-OH-D<sub>3</sub>, 11 % con la 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>2</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, 100 % con la 24,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>2</sub> y 24,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y 100 % con la fracción 25,26(OH)<sub>2</sub> D<sub>2</sub>. Se consideraron valores de suficiencia de vitamina D niveles  $\leq$  30 ng/mL basándonos en que por debajo de este valor se ha demostrado que aumentan los niveles de PTH (Vieth *et al* 2003, Hollis 2005) aunque actualmente éste sea un tema de debate activo con valores de recomendación variables quizá en torno a los 20 ng/mL más recientemente (Rosen 2011, Ross *et al* 2011).

**III. Fosfatasa Alcalina Osea (FAo).** La cuantificación sérica de la FAo se realizó mediante ensayo inmunológico específico (ELISA) determinando la actividad de la FA de origen óseo (METRA, Metra Biosystems, Mountain View, CA, USA). Reactividad cruzada del

100 % con la forma ósea; 3-8 % con la hepática; 0 % con la placentaria; 0,4 % con la intestinal. La sensibilidad de la técnica es de 0,7 ng.mL. La reproductibilidad intra e interensayo es de 3,5 y 6,2 % respectivamente. Valores normales, mujer: 10-22 U/L; hombre: 12-23 U/L.

**IV. Osteocalcina.** Se determinó mediante ensayo inmunológico específico (ELISA. N-MID® Osteocalcin, DRG). La sensibilidad de la técnica es de 0,4 ng/mL. La reproductibilidad intra e interensayo es de 2 y 4.4 % respectivamente. Valores normales: 10-40 ng/mL.

**V. P1NP.** La determinación del Propéptido Aminoterminal del procolágeno tipo 1 se realizó mediante RIA específico (Orion Diagnostica, Espoo, Finland). La sensibilidad de la técnica es de 2 µg/l. La reproductibilidad intra e interensayo es de 8 y 5 % respectivamente. Valores normales: 21-78 µg/l para el hombre y 19-102 en las mujeres.

**VI. Crosslaps (β-CTX).** La cuantificación de Crosslaps β en suero se realizó mediante enzoinmunoensayo específico (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra la región (EKAHDGGR) β-isomerizada de la cadena α1 del telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev Hovedgade, Denmark). La sensibilidad de la técnica es de 0,010 ng/mL. La reproductibilidad intra e interensayo es de 5,1 y 6,6 % respectivamente. Valores normales: 0,142-0,522 ng/mL para el hombre; 0,166-0,567 ng/mL en mujeres premenopáusicas y 0,251-0,761 ng/mL para mujeres posmenopáusicas.

**VII. OPG.** La determinación de OPG se realizará mediante inmunoensayo específico de doble anticuerpo (Biomedica, Immundiagnostik, Bensheim, Alemania). Esta técnica no está tan estandarizada como las anteriores en la práctica clínica habitual. El límite de detección es de 2,8 pg/mL y la variación intra e interensayo es de 4 y 8 % respectivamente.

### 2. 3. Análisis de discriminación alélica

La selección de SNPs para el estudio se realizó no solo dado su posible interés clínico sino también por las frecuencias de los mismos en otras poblaciones analizadas.

El ADN genómico se extrae de sangre venosa total (EDTA) con el método Qiagen (Hilden, Germany) y se almacena a -40°C hasta su análisis definitivo. El Genotipado se realizó mediante ensayos *Custom Taqman® SNP Genotyping assays (Assay-by-Design)* (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK) usando para la discriminación alélica sondas Taqman específicas marcadas con VIC y FAM, figura 9. Los *Primers* de oligonucleotidos para el estudio de los SNPs de OPG, se diseñaron en base a la secuencia del gen registrado en GenBank (AB008821). Las secuencias utilizadas para el diseño de los primers en los polimorfismos de OPG fueron:

- SNP 163 A/G del gen OPG (rs3102735): CATGAATGGGACCA CACTTTACAAG (forward) y TGCTCTAGGGTTTCGCTGTCT (reverse)
  
- SNP 245 T/G del gen OPG (rs3134070): CCCTAGAGC AAAGTGCCAAACT (forward) y AGCTTCCTACGCGCTGAAC (reverse)
  
- SNP 1181 G/C del gen OPG (rs2073618): CCAAGCCCCTGAGGTTTCC (forward) y CCCAGGGACTTACCACGAG (reverse)

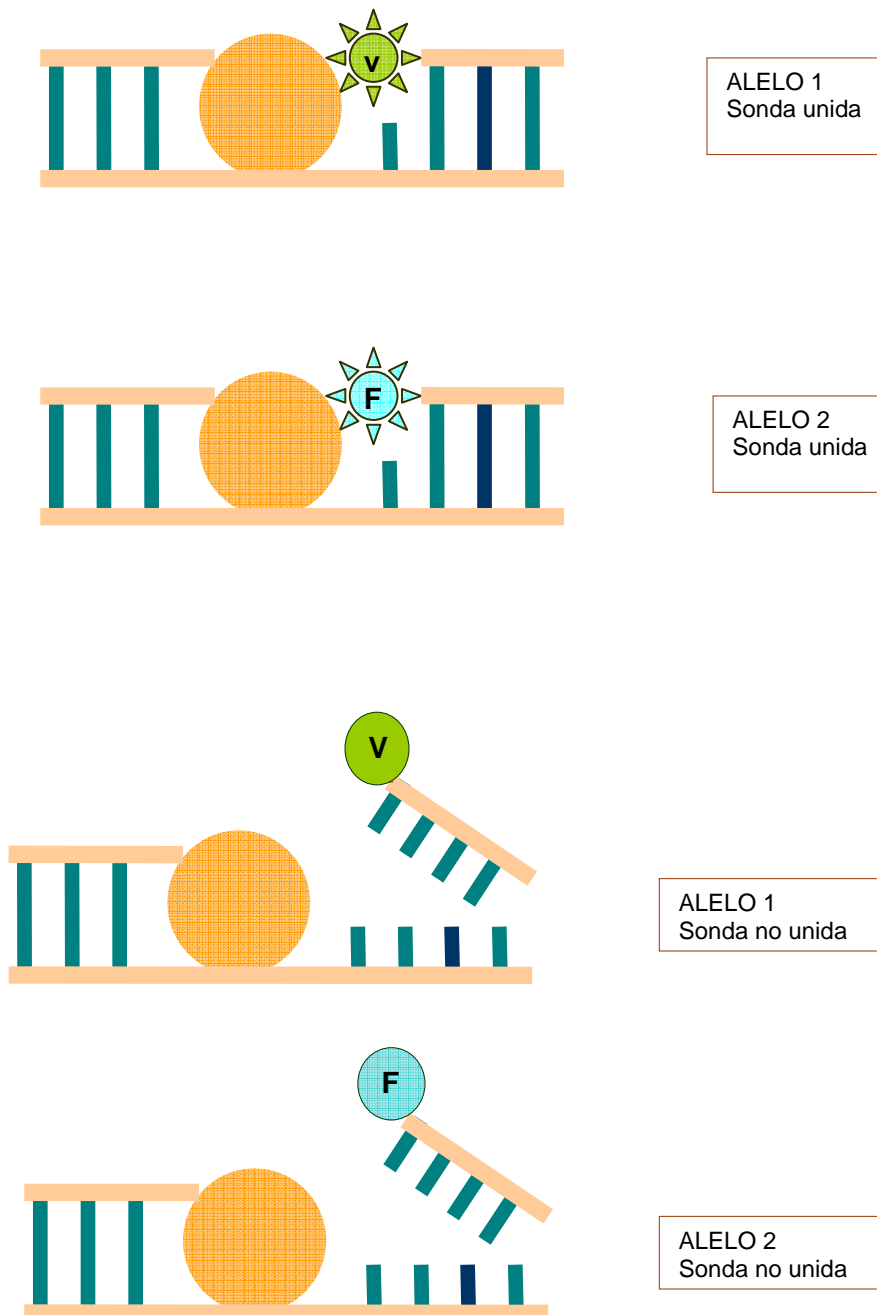


Las secuencias utilizadas en el diseño del resto de polimorfismos analizados fueron (información enviada en el ensayo):

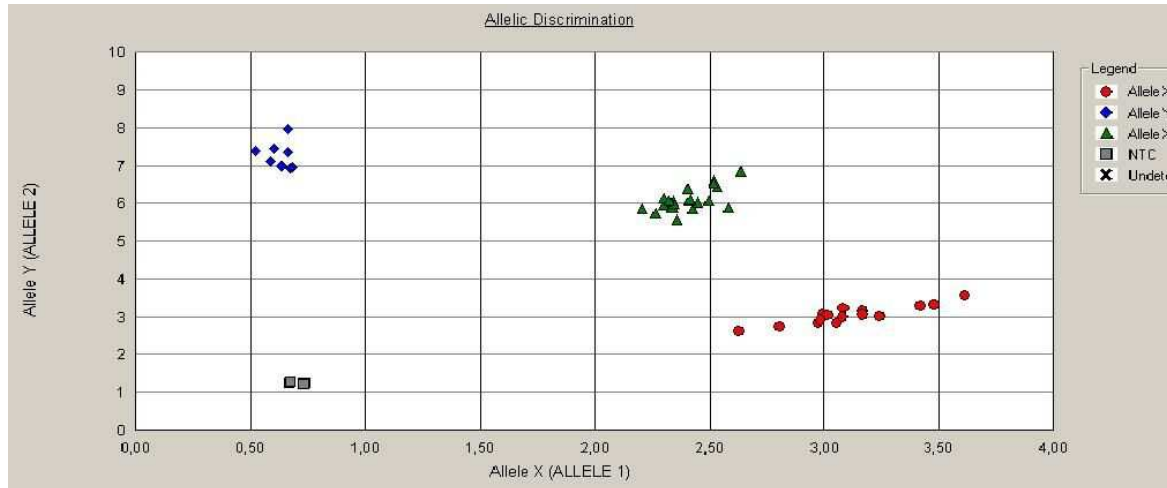
- SNP Ala-192-Val del gen *RANK* (rs1805034): CATCATGGGACAGAGAAAT  
CCGATG[C/T]GGTTTGCAGTTCTTCTCTGCCAGCT (context sequence)
  
- SNP (rs2277438) del gen *RANKL*: TTGTTGGGGACATAAAGACT  
CTTGC[A/G]AGTATGAATTTTTTGTCTTAAGTC (context sequence)
  
- SNP 393 T/C del gen *GNAS1* (rs7121): CCCGAGAACCAGTTCAGAGT  
(forward) y GGAAGTCAAAGTCAGGCACGTT (reverse)
  
- SNP rs219780 del gen *CLDN14*: AGTCGTTCCAGCCTGTACCCGCTGTG  
[C/T]GTGGCCGAGGTCAGGGGGGCC (context sequence)

La reacción de amplificación (PCR) se realiza en un volumen de 5 µL en un Termociclador Gene Amp® PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Las condiciones utilizadas para la reacción son: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos y 48 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 30 segundos y un alineamiento durante 1 minuto a 60 °C. Después de la amplificación, la lectura de fluorescencia e identificación alélica se hicieron en un detector ABI 7300 (Applied Biosystems), figura 10. Se estableció la bondad de la técnica por comparación con los resultados obtenidos por digestión enzimática en muestras analizadas por ambos procedimientos.

**Figura 9. Discriminación alélica mediante sondas marcadas con VIC y FAM.** Si la sonda es complementaria a la cadena de ADN, la enzima polimerasa (representada como un globo anaranjado) la incorpora a la misma con lo que se libera el marcador que lleva asociado (Vic o Fam). Al liberarse, estos marcadores emiten luz que puede ser detectada. Si la sonda no es complementaria, la enzima polimerasa no la puede incorporar a la cadena de ADN y la reacción lumínica no se produce.



**Figura 10. Ejemplo de placa de lectura de fluorescencia.** Los puntos rojos representan a los sujetos homocigotos XX, los rombos azules representan a los homocigotos YY y los triángulos verdes a los heterocigotos XY. Los cuadrados grises representan los sujetos no definidos o “blancos”.



### 3. DENSITOMETRÍA ÓSEA

La evaluación de la masa ósea se realizó mediante Absorciometría de Rayos-X a tres niveles (columna lumbar L2-L4), cadera (proyección cuello femoral y total) y radio distal utilizando un densitómetro Hologic QDR 4500 (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA). El coeficiente de variación fue de 1,2 % a nivel lumbar y proyección total de cadera y de 1,4 % para cuello femoral y radio distal. En las técnicas de densitometría los resultados se ofrecen en forma de valores absolutos y comparados con los valores de referencia). Los resultados relativos o comparados se ofrecen utilizando la puntuación T o T-score que supone la comparación de la medida obtenida respecto al valor medio máximo que se alcanza en el momento de mayor madurez del esqueleto (pico de masa ósea) y de la puntuación Z que es la comparación del valor obtenido con el valor medio de la población de similar sexo y edad que el paciente. Para ambos se utiliza como unidad la desviación estándar (DE) frente a la población de referencia. Según la OMS (Alexeeva *et al* 1994) la clasificación según resultados de puntuación T son los siguientes (sólo han sido diseñados para mujeres de raza blanca postmenopáusicas):

- Normal: T superior a  $-1$  DE
- Osteopenia: T entre  $-1$  y  $-2,5$  DE
- Osteoporosis: T igual o inferior a  $-2,5$  DE
- Osteoporosis establecida o severa: T igual o inferior a  $-2,5$  DE y presencia de fractura

## 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se incluyeron en el paquete estadístico SPSS 12.0. Al analizar los datos se hizo en primer lugar un estudio de la distribución normal o no de las variables analizadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

La comparación de variables entre los grupos HPP y control se realizó con el test de la T de Student en las variables que seguían una distribución normal y el test de la U de Mann Whitney en las que no la seguían. En cuanto a la comparación de parámetros relacionados con la expresión del HPP (valores densitométricos y parámetros bioquímicos) se realizó tomando un subgrupo de 114 sujetos del grupo control similar en edad y sexo al grupo de pacientes con HPP.

El análisis sobre si las frecuencias alélicas obtenidas cumplen el Equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó mediante el software HWSIM (accesible en <http://krunch.med.yale.edu/hwsim/>). Para el análisis de frecuencias de expresión en cada población respecto al grupo control se realizó un análisis de frecuencias alélicas y genotípicas contrastado con un Chi-cuadrado.

Por otro lado, se analizaron las diferencias en las expresiones clínicas, bioquímicas y densitométricas en cada grupo de expresión alélica. En el caso de variables con distribución normal se utilizó un ANCOVA para datos independientes (ajustado por posibles variables confusoras (peso, edad, etc.)). Para variables con distribución no normal se utilizó el test de Kruskal Wallis y en el caso de existir diferencias, el test de Bonferroni para concretar entre qué grupos.

Para el análisis de correlaciones entre 2 variables se utilizó el test de la "r" de Pearson para las variables que tenían una distribución normal y el test de la "s" de Spearman

para las variables que no tenían una distribución normal. Cuando se analizaron asociaciones entre 1 variable (dependiente) y un número de variables superior a 2 (variables independientes) se utilizó una regresión lineal múltiple (método “paso a paso”) tras transformación logarítmica de las variables con distribución no normal.

Una  $p < 0,05$  se consideró significativa para rechazar la hipótesis nula.

## v. Resultados

## 1. Características de la población de estudio

El número de pacientes con HPP fue de 298. En este grupo la relación mujeres/varones fue de 5,6/1 siendo postmenopáusicas la mayoría de las mujeres (87,2 %). La edad media fue de  $62 \pm 13$  años y el IMC medio fue de  $28,7 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup> respectivamente. La TAs en los pacientes con HPP fue de  $142,2 \pm 22,1$  mmHg y la TAd de  $80,8 \pm 10,9$  mmHg. Los niveles de 25-OH-vitamina D fueron de 17,2 (3-93) ng/mL en el grupo HPP y el porcentaje de pacientes con niveles considerados adecuados de 25-OH-vitamina D ( $\geq 30$  ng/mL) fue de un 15,2 %. En cuanto a las manifestaciones del HPP el porcentaje de fracturas y de litiasis renal fue de un 24,6 % y un 36 % respectivamente (tabla 1).

Los sujetos control fueron 328 voluntarios sanos siendo un 50 % mujeres y de éstas eran postmenopáusicas un 89,5 %. La media de edad fue de  $45 \pm 13$  años con un IMC medio de  $25,4 \pm 3,8$  kg/m<sup>2</sup>. La TAs en los sujetos control fue de  $119,9 \pm 19,3$  mmHg y la TAd fue de  $72,4 \pm 12,5$  mmHg siendo significativamente inferiores que los niveles de los sujetos HPP ( $p < 0,001$ ). Los niveles de 25-OH-vitamina D y el porcentaje de personas con niveles considerados adecuados ( $\geq 30$  ng/mL) fueron similares al del grupo de pacientes con HPP ( $p = 0,221$ ). El porcentaje de sujetos control con fracturas previas fue de un 21,8 % y el porcentaje de personas con litiasis renal documentada fue de 6,3 % siendo en ambos casos significativamente menor que en los sujetos con HPP ( $p < 0,001$ ). La media de los valores de todos los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo óseo estudiados se encontraba dentro de los valores de normalidad siendo menores que los observados en los sujetos con HPP ( $p < 0,001$ ). Los valores de DMO fueron significativamente superiores en todas las localizaciones estudiadas que los encontrados en los sujetos con HPP ( $p < 0,001$ ).



La comparación de valores densitométricos y parámetros bioquímicos también se realizó tomando un subgrupo de 114 sujetos del grupo control similar en edad y sexo al grupo de pacientes con HPP. Las características generales de los pacientes con HPP, del subgrupo de 114 sujetos control con edad y sexo similar al de los pacientes con HPP y su comparación están reflejadas en las tablas 1 y 1a pero los resultados de la comparación no fueron muy diferentes de la realizada con el grupo total de sujetos control excepto por la edad y la distribución de sexos.

**Tabla 1. Características y parámetros bioquímicos de los pacientes HPP y del subgrupo de 114 sujetos control similares en edad y sexo a los pacientes con HPP.**

	HPP	Controles	p
Edad (años)	62 ±13	59 ± 13	0,052
♀/♂	5,6/1	5/1	0,661
Menopausia ♀ (%)	89,5	87,2	0,536
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,7 ± 5,0	25,3 ± 3,8	< 0,001
TAS (mmHg)	142,2 ± 22,1	125,2 ± 16,9	< 0,001
TAD (mmHg)	80,8 ± 10,9	74,3 ± 13,4	< 0,001
Fracturas (%)	24,6	21	< 0,001
Litiasis renal (%)	36,0	6	< 0,001
Creatinina (mg/dL)	1,02 ± 0,29	0,98 ± 0,14	0,179
25-OH-VitD (ng/mL)	17,2 (3-93)	20,4 (6-42)	0,997
25-OH-VitD ≥ 30 ng/mL (%)	9,2	15,2	0,221
Calcio total (mg/dL)	10,7 (9,8-14,5)	9,4 (8,6-10,6)	< 0,001
Calcio iónico (mM)	1,47 (1,25-2,07)	1,23 (1,11-1,36)	< 0,001
Ca/Cr Orina 24h (mg/g)	201 (1-901)	124 (12-372)	0,005
PTH (pg/mL)	179 (59-1279)	37 (10-105)	< 0,001
Fosfatasa alcalina (U/L)	82,3 (20-373)	63,4 (33-198)	< 0,001
FAo (U/L)	32,9 (5-85)	22,1 (11-53)	< 0,001
P1NP (µg/L)	54,9 (11-255)	46,3 (15-145)	0,005
Crosslaps B (ng/mL)	0,814 (0,128-3,208)	0,475 (0,053-1,460)	< 0,001
Osteocalcina (ng/mL)	30,9 (7-175)	19,4 (6-39)	< 0,001
OPG sérica (pmol/L)	4,8 (0,01-12,42)	3,0 (0,89-5,61)	< 0,001

Datos expresados como media ± DE o mediana y rango para las variables no normales. TAS: presión arterial sistólica. TAD: presión arterial diastólica. Ca/Cr: cociente calcio/creatinina. FAo: fosfatasa alcalina ósea. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. OPG: osteoprotegerina

**Tabla 1a. Estudio mediante densitometría ósea de los pacientes HPP y del subgrupo de 114 sujetos control similares en sexo y edad a los pacientes con HPP.**

	HPP	Controles	p
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,879 ± 0,155	0,935 ± 0,134	<b>&lt; 0,001</b>
C Fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,691 ± 0,104	0,749 ± 0,120	<b>&lt; 0,001</b>
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,840 ± 0,145	0,887 ± 0,126	<b>&lt; 0,001</b>
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,629 ± 0,102	0,671 ± 0,696	<b>&lt; 0,001</b>
CL T Score	-1,8 ± 1,3	-1,4 ± 1,3	<b>0,005</b>
C Fem T Score	-2,1 ± 0,9	-1,6 ± 1,2	<b>&lt; 0,001</b>
Cad Tot T Score	-1,2 ± 1,1	-0,9 ± 1,0	<b>0,002</b>
Rad 1/3 T Score	-1,4 ± 1,5	-0,7 ± 1,0	<b>&lt; 0,001</b>
CL Z Score	-0,3 ± 1,5	-0,2 ± 1,2	0,391
C Fem Z Score	-0,4 ± 0,9	-0,1 ± 1,1	<b>0,004</b>
Cad Tot Z Score	0,0 ± 1,0	0,1 ± 1,0	0,333
Rad 1/3 Z Score	0,0 ± 1,3	0,5 ± 1,0	<b>0,001</b>

Datos expresados como media ± DE. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea.

T Score: DMO relacionada con el pico de masa ósea

Z Score: DMO relacionada con la de personas de la misma edad y sexo

## 2. Distribución alélica poblacional

Las frecuencias de los alelos no se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg excepto en el caso del SNP rs1805034 del *RANK* en el grupo de pacientes HPP ( $0,05 > p > 0,001$ ). Por este motivo, excluimos el SNP del *RANK* del estudio. La distribución de las frecuencias alélicas de todos los SNP estudiados fue similar en el grupo HPP y control y quedan reflejadas en la tabla 2. No existen diferencias en la distribución alélica de ninguno de los SNP analizados entre el grupo control y el grupo HPP.

Tabla 2. Frecuencias alélicas en el total de sujetos control y pacientes con HPP.

		HPP	Controles
OPG 163 A/G rs3102735	<b>AA</b>	70 %	74 %
	<b>AG</b>	28 %	24 %
	<b>GG</b>	2 %	2 %
OPG 245 T/G rs3134070	<b>TT</b>	90,1 %	91,6 %
	<b>TG</b>	9,3 %	7,6 %
	<b>GG</b>	0,6 %	0,4 %
OPG 1181 G/C rs2073618	<b>GG</b>	27 %	26 %
	<b>GC</b>	44 %	47 %
	<b>CC</b>	28 %	27 %
RANKL rs2277438	<b>AA</b>	74,1 %	67,5 %
	<b>AG</b>	24,3 %	30,8 %
	<b>GG</b>	1,6 %	1,7 %
RANK rs1805034	<b>AA</b>	22 %	22 %
	<b>AG</b>	44 %	47 %
	<b>GG</b>	34 %	31 %
GNAS1 393 T/C rs7121	<b>TT</b>	26 %	23 %
	<b>TC</b>	45 %	54 %
	<b>CC</b>	29 %	23 %
CLDN14 rs219780	<b>CC</b>	65 %	65 %
	<b>TC</b>	30 %	31 %
	<b>TT</b>	5 %	4 %

*Chi<sup>2</sup>: estadísticamente no significativo para ninguno de los SNP*

La distribución de la frecuencia de fracturas o de litiasis renal en los pacientes con HPP no fue diferente entre los distintos grupos alélicos en ninguno de los SNP estudiados.

**Tabla 3. Distribución de la presencia de litiasis renal en los pacientes con HPP según los diferentes SNP estudiados.**

		Litiasis	No Litiasis
OPG 163 A/G rs3102735	<b>AA</b>	34,5 %	65,5 %
	<b>AG</b>	40 %	60 %
	<b>GG</b>	28,6 %	71,4 %
OPG 245 T/G rs3134070	<b>TT</b>	35,2 %	64,8 %
	<b>TG</b>	40,7 %	59,3 %
	<b>GG</b>	100 %	0
OPG 1181 G/C rs2073618	<b>GG</b>	38,7 %	61,3 %
	<b>GC</b>	35,2 %	64,8 %
	<b>CC</b>	34,9 %	65,1 %
RANKL rs2277438	<b>AA</b>	37,6 %	62,4 %
	<b>AG</b>	31,9 %	68,1 %
	<b>GG</b>	33,3 %	66,7 %
GNAS1 393 T/C rs7121	<b>TT</b>	39,2 %	60,8 %
	<b>TC</b>	34,7 %	65,3 %
	<b>CC</b>	34,9 %	65,1 %
CLDN14 rs219780	<b>CC</b>	36,4 %	63,6 %
	<b>TC</b>	37,5 %	62,5 %
	<b>TT</b>	26,7 %	73,3 %

*Chi<sup>2</sup>: estadísticamente no significativo para ninguno de los SNP*

**Tabla 4. Distribución de la presencia de fracturas en los pacientes con HPP según los diferentes SNP estudiados.**

		Fracturas	No Fracturas
OPG 163 A/G rs3102735	<b>AA</b>	25,4 %	74,6 %
	<b>AG</b>	25,3 %	74,7 %
	<b>GG</b>	0	100 %
OPG 245 T/G rs3134070	<b>TT</b>	25,4 %	74,6 %
	<b>TG</b>	20 %	80 %
	<b>GG</b>	0	100 %
OPG 1181 G/C rs2073618	<b>GG</b>	20,3 %	79,7 %
	<b>GC</b>	29,2 %	70,8 %
	<b>CC</b>	22,4 %	77,6 %
RANKL rs2277438	<b>AA</b>	25,1 %	74,9 %
	<b>AG</b>	24 %	76 %
	<b>GG</b>	25 %	75 %
GNAS1 393 T/C rs7121	<b>TT</b>	18,7 %	81,3 %
	<b>TC</b>	30,9 %	69,1 %
	<b>CC</b>	21,6 %	78,4 %
CLDN14 rs219780	<b>CC</b>	25,3 %	74,7 %
	<b>TC</b>	23,9 %	76,1 %
	<b>TT</b>	20 %	80 %

*Chi<sup>2</sup>: estadísticamente no significativo para ninguno de los SNP*

### 3. Análisis genotípico

#### 3. 1. SNP 163 A/G del gen de *OPG*

En la comparación entre los distintos genotipos del SNP 163 A/G del gen *OPG* en pacientes con HPP (tablas 5 y 5a) no encontramos diferencias significativas al analizar la edad, el IMC, la DMO en cadera y columna lumbar y los marcadores de remodelación ósea excepto la osteocalcina. Los niveles de calcio total (mg/dL) fueron ligeramente inferiores en el genotipo GG=10,5 (9-13) (mediana y rango) respecto de los grupos AA y AG (10,7 (8,7-13,5) y 11 (8,5-14,5) respectivamente) en el análisis mediante el test de Kruskal-Wallis ( $p=0,041$ ) pero no se encontraron diferencias individuales al hacer la corrección de Bonferroni. Los niveles de osteocalcina (ng/mL) fueron mayores en el grupo GG=79 (19-175) respecto de los grupos AA y AG (31 (7-126) y 29 (7-67) respectivamente) en el análisis mediante el test de Kruskal-Wallis ( $p<0,001$ ) confirmado mediante el test de Bonferroni ( $p <0,001$ ) en ambas comparaciones. Existe una tendencia no estadísticamente significativa hacia valores más elevados de Crosslaps  $\beta$  en el grupo GG respecto de los otros dos grupos.

El valor de DMO ( $g/cm^2$ ) en el tercio distal de radio fue menor en el grupo GG=0,501  $\pm$  0,147 respecto de los grupos AA y AG (0,629  $\pm$  0,096;  $p= 0,037$ ; 0,635  $\pm$  0,104;  $p=0,038$  respectivamente) mediante el test de Anova.

Analizando estos mismos parámetros en el subgrupo de mujeres los resultados fueron similares. Al analizar las posibles diferencias en la DMO entre los diferentes genotipos en el grupo control no se encontraron diferencias para ninguna localización incluyendo el tercio distal del radio (tabla 11).



**Tabla 5. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 163 A/G del gen OPG en los pacientes con HPP. Estudio densitométrico.**

OPG 163 A/G rs 3102735		Media $\pm$ DE	p
Edad al diagnóstico (años)	AA	62 $\pm$ 12	0,449
	AG	61 $\pm$ 14	
	GG	68 $\pm$ 14	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	AA	28,8 $\pm$ 5,1	0,813
	AG	28,4 $\pm$ 4,7	
	GG	28,8 $\pm$ 3,1	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,887 $\pm$ 0,152	0,213
	AG	0,857 $\pm$ 0,146	
	GG	0,803 $\pm$ 0,236	
C Fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,690 $\pm$ 0,107	0,667
	AG	0,686 $\pm$ 0,094	
	GG	0,726 $\pm$ 0,139	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,841 $\pm$ 0,149	0,687
	AG	0,829 $\pm$ 0,133	
	GG	0,877 $\pm$ 0,140	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,629 $\pm$ 0,096	<b>0,039</b>
	AG	0,635 $\pm$ 0,104	<b>AA-GG= 0,038</b>
	GG	0,501 $\pm$ 0,147	<b>AG-GG= 0,037</b>

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*

**Tabla 5a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 163 A/G del gen OPG en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos.**

OPG 163 A/G rs 3102735		Mediana y rango	p
Calcio Total (mg/dL)	AA	10,7 (8,7-13,5)	<b>0,041 (+)</b>
	AG	11,0 (8,5-14,5)	
	GG	10,5 (9-13)	
Calcio iónico (mM)	AA	1,50 (1,21-2,7)	0,198
	AG	1,50 (1,20-1,96)	
	GG	1,40 (1,31-1,51)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	AA	17 (3-93)	0,252
	AG	18 (4-47)	
	GG	15 (8-24)	
PTH (pg/mL)	AA	143 (58-873)	0,671
	AG	136 (59-1279)	
	GG	133 (86-747)	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	AA	80 (20-373)	0,723
	AG	87 (45-302)	
	GG	88 (46-191)	
OPG sérica (pmol/L)	AA	4,8 (0,01-12,4)	0,735
	AG	4,9 (2,01-10,00)	
	GG	3,9 (2,39-5,6)	
P1NP (µg/L)	AA	55 (11-255)	0,826
	AG	53 (16-140)	
	GG	63 (17-155)	
Crosslaps β (ng/mL)	AA	0,829 (0,044-2,853)	0,506
	AG	0,762 (0,192-2,182)	
	GG	1,041 (0,333-3,208)	
FA Ósea (U/L)	AA	32 (5-79)	0,081
	AG	33 (12-84)	
	GG	49 (19-85)	
Osteocalcina (ng/mL)	AA	31 (7-126)	<b>&lt;0,001</b> <b>AG-GG &lt;0,001</b> <b>AA-GG &lt;0,001</b>
	AG	29 (7-67)	
	GG	79 (19-175)	

Datos expresados como mediana y rango. OPG: osteoprotegerina. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. FA: fosfatasa alcalina. (+) No se demostraron diferencias individuales en el análisis con el test de Bonferroni

### 3. 2. SNP 245 T/G del gen *OPG*

En la comparación entre diferentes grupos alélicos del SNP 245 T/G del gen *OPG* en los pacientes con HPP (tablas 6 y 6a) encontramos mediante el test de Kruskal-Wallis que los niveles de calcio total (mg/dL) (GG=12,3 ± 0,9; TT= 10,7 ± 0,7; TG=10,9 ± 1,1; GG-TT (p= 0,012) y GG-TG (p= 0,032), Crosslaps β (ng/mL) (GG= 1,770 ± 2,033; TT= 0,816 ± 0,512; TG= 0,726 ± 0,356; GG-TT (p= 0,035) y GG-TG (p= 0,029) y de osteocalcina (ng/mL) (GG=175; TT=30 ± 19,0; TG= 31 ± 18,2; GG-TT (p<0,001) y GG-TG (p<0,001) estaban más elevados significativamente en el grupo GG en comparación con los grupos TT y TG.

La DMO (g/cm<sup>2</sup>) fue menor significativamente en el tercio distal del radio en el grupo GG en comparación con los grupos TT y TG según el test de Anova a pesar de la reducida frecuencia del genotipo GG (p= 0,003) TT= 0,621 ± 0,100; TG= 0,646 ± 0,105; GG= 0,326 (GG-TT p= 0,003 y GG-TG p= 0,01). No encontramos estas diferencias al estudiar la DMO en el resto de localizaciones esqueléticas.

Estos resultados fueron similares cuando analizamos por separado el subgrupo de mujeres. En el grupo control no encontramos diferencias en DMO entre genotipos en ninguna de las localizaciones estudiadas incluyendo el tercio distal del radio (tabla 11).

**Tabla 6. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 245 T/G del gen OPG en los pacientes con HPP. Estudio densitométrico.**

OPG 245 T/G rs 3134070		Media $\pm$ DE	p
Edad al diagnóstico (años)	TT	61 $\pm$ 13	0,298
	TG	64 $\pm$ 15	
	GG	70 $\pm$ 8	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	TT	28,6 $\pm$ 4,9	0,663
	TG	29,5 $\pm$ 5,1	
	GG	28,6 $\pm$ 3,5	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,871 $\pm$ 0,149	0,234
	TG	0,909 $\pm$ 0,168	
	GG	0,672	
C fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,682 $\pm$ 0,108	0,151
	TG	0,691 $\pm$ 0,105	
	GG	0,748 $\pm$ 0,053	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,831 $\pm$ 0,145	0,484
	TG	0,828 $\pm$ 0,139	
	GG	0,881 $\pm$ 0,008	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,621 $\pm$ 0,100	<b>0,003</b>
	TG	0,646 $\pm$ 0,105	<b>GG-TT=0,003</b>
	GG	0,326	<b>GG-TG=0,01</b>

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*

**Tabla 6a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 245 T/G del gen OPG en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos.**

OPG 245 T/G rs3134070		Mediana y rango	p
Calcio Total (mg/dL)	TT	10,7 (8,7-13,5)	<b>0,005</b> <b>GG-TT= 0,012</b> <b>GG-TG= 0,032</b>
	TG	10,9 (8,5-14,5)	
	GG	12,3 (11,7-13)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	TT	17,0 (3-93)	0,702
	TG	17,5 (6,6-39,7)	
	GG	14,5 (12,0-17,0)	
PTH (pg/mL)	TT	141 (58-873)	0,339
	TG	147 (79-1279)	
	GG	264 (155-373)	
Calcio iónico (mM)	TT	1,47 (1,21-2,07)	0,565
	TG	1,51 (1,20-1,96)	
	GG	1,51	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	TT	81 (20-373)	0,301
	TG	89 (55-156)	
	GG	122,5 (54-191)	
OPG sérica (pmol/L)	TT	4,8 (0,01-12,42)	0,957
	TG	5,1 (3,72-9,2)	
	GG	4,8 (4,00-5,6)	
P1NP (µg/L)	TT	54 (11-255)	0,204
	TG	62 (18-110)	
	GG	91 (27-155)	
Crosslaps β (ng/mL)	TT	0,816 (0,44-2,853)	<b>0,034</b> <b>GG-TT= 0,035</b> <b>GG-TG = 0,029</b>
	TG	0,726 (0,192-1,342)	
	GG	1,77 (0,333-3,208)	
FA Ósea (U/L)	TT	33 (5-84)	0,196
	TG	35 (12-63)	
	GG	52 (19-85)	
Osteocalcina (ng/mL)	TT	30 (7-126)	<b>&lt;0,001</b> <b>GG-TT&lt;0,001</b> <b>GG-TG&lt;0,001</b>
	TG	31 (7,2-67)	
	GG	175	

Datos expresados como mediana y rango. OPG: osteoprotegerina. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. FA: fosfatasa alcalina

### 3. 3. SNP 1181 G/C del gen *OPG*

En la comparación mediante el test de Kruskal-Wallis entre genotipos del SNP 1181 G/C del gen *OPG* en los pacientes con HPP (tablas 7 y 7a) los niveles de osteocalcina (ng/mL) fueron mayores en el grupo GG respecto del GC ( $p=0,004$ ) (GG= 39 (9-175), GC=27 (7-62), CC=30 (7-80) aunque no respecto del CC. Los niveles de FAo (U/L) fueron mayores en el grupo GG respecto de los grupos GC y CC ( $p=0,01$  y  $0,018$  respectivamente) GG=39 (12-85), GC=31 (5-84), CC=31 (12-72). Encontramos una tendencia no estadísticamente significativa hacia niveles mayores de PTH, FA y Crosslaps  $\beta$  en el grupo GG respecto de los otros dos grupos. PTH (pg/mL): GG= 159 (41-873), GC=152 (32-1279), CC= 143 (48-859)  $p=0,759$ . FA (U/L): GG= 83 (21-191), GC=87 (120-373), CC=73 (29-302),  $p=0,162$ . Crosslaps  $\beta$  (ng/mL): GG=0,977 (0,210-3,208), GC=0,777 (0,192-2,500), CC=0,747 (0,044-3,208),  $p=0,044$ . En el caso de los Crosslaps  $\beta$  no se confirmó dicha diferencia tras realizar la corrección de Bonferroni.

No encontramos diferencias en la DMO en ninguna de las localizaciones estudiadas mediante el test de Anova entre los distintos grupos alélicos.

Los resultados del estudio del subgrupo de mujeres son superponibles a los generales. En el estudio del grupo control encontramos niveles significativamente menores de DMO ( $\text{g/cm}^2$ ) en los sujetos GG respecto de los CC ( $0,872 \pm 0,155$  vs  $0,983 \pm 0,170$ ;  $p=0,028$ ) en columna lumbar (tabla 11).

**Tabla 7. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 1181 G/C del gen OPG en los pacientes con HPP. Estudio densitométrico.**

OPG 1181 G/C rs2073618		Media $\pm$ DE	p
Edad al diagnóstico (años)	GG	62 $\pm$ 12	0,906
	GC	62 $\pm$ 14	
	CC	61 $\pm$ 13	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	GG	29,9 $\pm$ 5,5	0,542
	GC	28,3 $\pm$ 4,5	
	CC	28,9 $\pm$ 5,1	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	GG	0,885 $\pm$ 0,150	0,448
	GC	0,891 $\pm$ 0,147	
	CC	0,854 $\pm$ 0,161	
C fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	GG	0,679 $\pm$ 0,101	0,440
	GC	0,697 $\pm$ 0,111	
	CC	0,691 $\pm$ 0,097	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	GG	0,834 $\pm$ 0,153	0,926
	GC	0,842 $\pm$ 0,150	
	CC	0,840 $\pm$ 0,132	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	GG	0,630 $\pm$ 0,100	0,524
	GC	0,619 $\pm$ 0,110	
	CC	0,634 $\pm$ 0,093	

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*

**Tabla 7a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 1181 G/C del gen *OPG* en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos.**

<i>OPG</i> 1181 G/C rs2073618		Mediana y Rango	p
Calcio Total (mg/dL)	GG	10,9 (9,1-14,5)	0,438
	GC	10,7 (8,5-13)	
	CC	10,8 (9-13)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	GG	17 (3-50)	0,892
	GC	17 (4-93)	
	CC	17 (3-55)	
PTH (pg/mL)	GG	142 (59-873)	0,306
	GC	147 (58,8-1279)	
	CC	132 (59-859)	
Calcio iónico (mM)	GG	1,47 (1,20-1,96)	0,254
	GC	1,47 (1,25-1,79)	
	CC	1,48 (1,21-2,07)	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	GG	83 (21-191)	0,162
	GC	87 (20-373)	
	CC	73 (29-302)	
OPG sérica (pmol/L)	GG	5,0 (0,01-11,53)	0,566
	GC	4,7 (1,21-10)	
	CC	4,7 (2,1-12,42)	
P1NP (µg/L)	GG	63 (21-155)	0,518
	GC	52 (18-255)	
	CC	51 (11-142)	
Crosslaps β (ng/mL)	GG	0,977 (0,210-3,208)	<b>0,044</b>
	GC	0,777 (0,192-2,500)	
	CC	0,747 (0,044-3,208)	
FA Ósea (U/L)	GG	39 (12-85)	<b>0,016</b> <b>GG-GC=0,01</b> <b>GG-CC=0,018</b>
	GC	31 (5-84)	
	CC	31 (12-72)	
Osteocalcina (ng/mL)	GG	39 (9-175)	<b>0,009</b> <b>GG-GC=0,004</b>
	GC	27 (7-62)	
	CC	30 (7-80)	

Datos expresados como mediana y rango. *OPG*: osteoprotegerina. *P1NP*: propéptido amino-terminal del procólágeno 1. *FA*: fosfatasa alcalina



### 3. 4. SNP rs2277438 del gen *RANKL*

En la comparación entre genotipos del SNP rs2277438 del gen *RANKL* en pacientes con HPP (tablas 8 y 8a) encontramos una tendencia estadísticamente no significativa hacia hacia mayor edad media en el genotipo GG respecto de los grupos AA y AG (AA=  $62 \pm 13$ ; AG=  $61 \pm 13$ ; GG=  $65 \pm 10$ ;  $p= 0,812$ ), mayor IMC (AA=  $28,6 \pm 4,6$ ; AG=  $28,8 \pm 5,5$ ; GG=  $33,6 \pm 6,9$ ;  $p=0,079$ ), niveles mayores de FAo (U/L) (AA= 33 (5-86); AG= 31 (11-80); GG= 44 (36-55);  $p= 0,200$ ), hacia niveles menores de DMO en el tercio distal del radio ( $\text{g/cm}^2$ ): (AA=  $0,628 \pm 0,106$ ; AG=  $0,606 \pm 0,100$ ; GG=  $0,547 \pm 0,074$ ;  $p= 0,835$ ) y hacia niveles menores de DMO en cadera total ( $\text{g/cm}^2$ ) (AA=  $0,834 \pm 0,137$ ; AG=  $0,822 \pm 0,164$ ; GG=  $0,791 \pm 0,118$ ;  $p= 0,502$ ).

Cuando se repitieron estos procedimientos en el subgrupo de mujeres los resultados fueron similares. En el grupo control no encontramos ninguna diferencia entre los distintos genotipos al estudiar la DMO en todas las localizaciones (tabla 11).

**Tabla 8. Comparación entre los distintos genotipos del SNP rs2277438 del gen RANKL en los pacientes con HPP. Estudio densitométrico**

RANKL rs2277438		Media $\pm$ DE	p
Edad al diagnóstico (años)	AA	62 $\pm$ 13	0,812
	AG	61 $\pm$ 13	
	GG	65 $\pm$ 10	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	AA	28,6 $\pm$ 4,6	0,079
	AG	28,8 $\pm$ 5,5	
	GG	33,6 $\pm$ 6,9	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,872 $\pm$ 0,153	0,363
	AG	0,877 $\pm$ 0,146	
	GG	0,822 $\pm$ 0,148	
C fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,683 $\pm$ 0,103	0,818
	AG	0,683 $\pm$ 0,122	
	GG	0,661 $\pm$ 0,057	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,834 $\pm$ 0,137	0,502
	AG	0,823 $\pm$ 0,164	
	GG	0,791 $\pm$ 0,118	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	AA	0,628 $\pm$ 0,106	0,835
	AG	0,606 $\pm$ 0,100	
	GG	0,543 $\pm$ 0,074	

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*

**Tabla 8a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP rs2277438 del gen RANKL en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos**

RANKL rs2277438		Mediana y rango	p
Calcio Total (mg/dL)	AA	10,8 (9-14,5)	0,339
	AG	10,6 (8,5-11,8)	
	GG	10,5 (10-10,9)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	AA	17 (3-93)	0,594
	AG	17 (4-55)	
	GG	15 (12-21)	
PTH (pg/mL)	AA	141 (58,8-1279)	0,803
	AG	139 (66-707)	
	GG	141 (63,3-220,7)	
Calcio iónico (mM)	AA	1,47 (1,20-2,07)	0,351
	AG	1,44 (1,20-1,74)	
	GG	1,48 (1,37-1,57)	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	AA	82 (20-373)	0,956
	AG	82 (21-339)	
	GG	76 (45-111)	
OPG sérica (pmol/L)	AA	4,85 (0,01-11,44)	0,411
	AG	4,77 (1,21-12,42)	
	GG	5,63 (4,3-7,5)	
P1NP (µg/L)	AA	53 (11-192)	0,954
	AG	55 (10-255)	
	GG	52 (39-68)	
Crosslaps β (ng/mL)	AA	0,808 (0,117-3,208)	0,847
	AG	0,776 (0,044-2,853)	
	GG	0,867 (0,600-1,228)	
FA Ósea (U/L)	AA	33 (5-86)	0,200
	AG	31 (12-80)	
	GG	44 (36-55)	
Osteocalcina (ng/mL)	AA	30 (7-175)	0,975
	AG	30 (6-126)	
	GG	26 (14-44)	

*Datos expresados como mediana y rango. OPG: osteoprotegerina. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. FA: fosfatasa alcalina*

### 3. 5. SNP 393 T/C del gen *GNAS1*

En el estudio del polimorfismo T/C 393 del gen *GNAS1* encontramos una tendencia estadísticamente no significativa en cuanto a mayor edad media en el grupo genotípico CC respecto del resto de grupos genotípicos y hacia mayores niveles de PTH, calcio iónico, P1NP, Crosslaps  $\beta$  y osteocalcina. (tablas 9 y 9a).

En el mismo grupo genotípico CC encontramos también una tendencia no estadísticamente significativa hacia menor DMO en todas las localizaciones excepto en el tercio distal del radio.

Cuando se repitieron estos procedimientos en el subgrupo de mujeres los resultados fueron similares. En el grupo control no encontramos ninguna diferencia entre los distintos genotipos al estudiar la DMO en todas las localizaciones aunque existe la misma tendencia no estadísticamente significativa hacia menor DMO en el grupo CC en todas las localizaciones excepto en tercio distal del radio (tabla 11).

**Tabla 9. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 393 T/C del gen *GNAS1* en los pacientes con HPP. Estudio densitométrico.**

<i>GNAS1</i> T/C 393 rs7121		Media ± DE	p
Edad al diagnóstico (años)	TT	61 ± 12	0,482
	TC	61 ± 14	
	CC	69 ± 13	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	TT	29 ± 5,7	0,265
	TC	29,1 ± 4,7	
	CC	27,9 ± 5,0	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,878 ± 0,151	0,658
	TC	0,890 ± 0,152	
	CC	0,862 ± 0,141	
C fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,697 ± 0,103	0,751
	TC	0,694 ± 0,098	
	CC	0,680 ± 0,098	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,839 ± 0,163	0,900
	TC	0,849 ± 0,143	
	CC	0,832 ± 0,123	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	TT	0,623 ± 0,120	0,985
	TC	0,624 ± 0,095	
	CC	0,629 ± 0,098	

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*

**Tabla 9a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP 393 T/C del gen *GNAS1* en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos.**

<i>GNAS1</i> T/C 393 rs7121		Mediana y rango	p
Calcio Total (mg/dL)	TT	10,8 (10,6-11)	0,863
	TC	10,7 (10,6-10,9)	
	CC	10,8 (10,6-11)	
Calcio iónico (mM)	TT	1,47 (1,33-2,07)	0,215
	TC	1,46 (1,21-1,93)	
	CC	1,49 (1,2-1,83)	
PTH (pg/mL)	TT	162 (66-688)	0,137
	TC	169 (59-747)	
	CC	214 (68-1279)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	TT	18 (3-55)	0,327
	TC	17 (3-93)	
	CC	16 (4-40)	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	TT	79 (37-191)	0,701
	TC	86 (30-373)	
	CC	81 (20-339)	
OPG sérica (pmol/L)	TT	4,6 (3,9-5,4)	0,422
	TC	5 (4,4-5,7)	
	CC	4,5 (3,5-5,4)	
P1NP (µg/L)	TT	55,1 (44,4-63,4)	0,447
	TC	51,6 (46,5-58)	
	CC	62,7 (40,3-72,7)	
FA Ósea (U/L)	TT	31,7 (27,2-36)	0,587
	TC	34,1 (30,6-37,1)	
	CC	34,1 (39,4-36,5)	
Crosslaps β (ng/mL)	TT	0,839 (0,646-0,978)	0,217
	TC	0,798 (0,679-0,893)	
	CC	0,872 (0,697-1,064)	
Osteocalcina (ng/mL)	TT	27,9 (21-33,7)	0,116
	TC	30,4 (26,8-35)	
	CC	36,4 (29,6-39,8)	

*Datos expresados como mediana y rango. OPG: osteoprotegerina. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. FA: fosfatasa alcalina*

### 3. 6. SNP rs219780 del gen *CLDN14*

En el estudio del polimorfismo rs219780 del gen de la Claudina 14 encontramos una tendencia estadísticamente no significativa hacia niveles menores de calcio iónico, PTH, fosfatasa alcalina ósea, Crosslaps  $\beta$  y osteocalcina en el grupo genotípico TT respecto del resto de grupos. No encontramos ninguna diferencia en los niveles de densidad mineral ósea entre los distintos grupos genotípicos en los pacientes con hiperparatiroidismo primario. Tablas 10 y 10a.

Cuando se repitieron estos procedimientos en el subgrupo de mujeres los resultados fueron similares. En el grupo control no encontramos ninguna diferencia entre los distintos genotipos al estudiar la DMO en todas las localizaciones aunque existe una tendencia hacia niveles menores de DMO en el grupo genotípico TT respecto de los otros dos grupos en todas las localizaciones, especialmente en columna lumbar (tabla 11). Esta tendencia se mantuvo cuando hicimos el estudio de las mujeres del grupo control por separado, sin que la tendencia variase ni se hiciese estadísticamente significativa ( $p=0,086$ ).

**Tabla 10. Comparación entre los distintos genotipos del SNP rs219780 del gen de Claudina 14 en los pacientes con HPP.**

CLDN14 rs219780		Media ± DE	p
Edad al diagnóstico (años)	CC	61 ± 13	0,739
	TC	62 ± 12	
	TT	60 ± 10	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	CC	28,6 ± 4,9	0,665
	TC	29,0 ± 4,9	
	TT	29,7 ± 6,6	
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> )	CC	0,892 ± 0,142	0,148
	TC	0,843 ± 0,148	
	TT	0,892 ± 0,141	
C fem DMO (g/cm <sup>2</sup> )	CC	0,697 ± 0,098	0,539
	TC	0,676 ± 0,094	
	TT	0,704 ± 0,138	
Cad Tot DMO (g/cm <sup>2</sup> )	CC	0,859 ± 0,141	0,071
	TC	0,806 ± 0,141	
	TT	0,837 ± 0,170	
Rad 1/3 DMO (g/cm <sup>2</sup> )	CC	0,635 ± 0,103	0,482
	TC	0,606 ± 0,103	
	TT	0,626 ± 0,107	

*Datos expresados como media y desviación estándar. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea*



**Tabla 10a. Comparación entre los distintos genotipos del SNP rs219780 del gen de Claudina 14 en los pacientes con HPP. Parámetros bioquímicos.**

<i>CLDN14</i> rs219780		Mediana y rango	p
Calcio Total (mg/dL)	CC	10,8 (8,7-13,5)	0,999
	TC	10,8 (8,5-14,5)	
	TT	10,7 (9,4-13)	
Calcio iónico (mM)	CC	1,48 (1,23-2,07)	0,051
	TC	1,47 (1,2-1,96)	
	TT	1,41 (1,21-1,86)	
PTH (pg/mL)	CC	177 (59-1279)	0,192
	TC	187 (59-859)	
	TT	157 (71-529)	
25-OH-Vitamina D (ng/mL)	CC	18 (3-93)	0,520
	TC	15 (3-32)	
	TT	17 (4-47)	
Fosfatasa Alcalina (U/L)	CC	82 (20-373)	0,990
	TC	86 (29-339)	
	TT	76 (48-234)	
OPG sérica (pmol/L)	CC	4,7 (1,2-12,4)	0,904
	TC	4,7 (0,1-11,5)	
	TT	5,1 (2,4-10)	
P1NP (µg/L)	CC	55,0 (13-164)	0,951
	TC	51,9 (17-255)	
	TT	52,1 (11-142)	
FA Ósea (U/L)	CC	33,5 (12-84)	0,774
	TC	34,7 (12-85)	
	TT	27,9 (5-57)	
Crosslaps β (ng/mL)	CC	0,818 (0,044-2,853)	0,827
	TC	0,876 (0,201-3,204)	
	TT	0,723 (0,117-1,842)	
Osteocalcina (ng/mL)	CC	30,3 (7-105,8)	0,893
	TC	33,8 (7,2-179)	
	TT	29,9 (7-80)	

*Datos expresados como mediana y rango. OPG: osteoprotegerina. P1NP: propéptido amino-terminal del procolágeno 1. FA: fosfatasa alcalina*

**Tabla 11. Distribución de la densidad mineral ósea en función de los genotipos de los SNPs estudiados en los sujetos control.**

		DMO CL (g/cm <sup>2</sup> )	DMO C Fem (g/cm <sup>2</sup> )	DMO Cad Tot (g/cm <sup>2</sup> )	DMO 1/3 Rad Distal (g/cm <sup>2</sup> )
OPG 163 A/G	<b>AA</b>	0,980 ± 0,137	0,805 ± 0,134	0,942 ± 0,147	0,693 ± 0,076
	<b>AG</b>	0,997 ± 0,127	0,820 ± 0,132	0,948 ± 0,126	0,697 ± 0,089
	<b>GG</b>	1,049 ± 0,155	0,872 ± 0,098	0,981 ± 0,083	0,734 ± 0,106
OPG 245 T/G	<b>TT</b>	0,974 ± 0,136	0,777 ± 0,119	0,908 ± 0,129	0,696 ± 0,077
	<b>TG</b>	0,936 ± 0,130	0,760 ± 0,131	0,873 ± 0,095	0,685 ± 0,109
	<b>GG</b>	0,994	0,763	0,870	0,662
OPG 1181 G/C	<b>GG</b>	0,965 ± 0,136 (+)	0,802 ± 0,135	0,937 ± 0,141	0,694 ± 0,075
	<b>GC</b>	0,977 ± 0,129 (+)	0,813 ± 0,133	0,947 ± 0,142	0,693 ± 0,083
	<b>CC</b>	1,020 ± 0,141 (+)	0,811 ± 0,130	0,950 ± 0,140	0,670 ± 0,077
RANKL rs2277438	<b>AA</b>	0,974 ± 0,129	0,781 ± 0,123	0,905 ± 0,127	0,696 ± 0,082
	<b>AG</b>	0,962 ± 0,150	0,766 ± 0,115	0,901 ± 0,125	0,692 ± 0,073
	<b>GG</b>	1,010	0,818	1,082	<b>n=0</b>
GNAS1 393 T/C	<b>TT</b>	0,967 ± 0,160	0,772 ± 0,135	0,894 ± 0,131	0,690 ± 0,070
	<b>TC</b>	0,977 ± 0,133	0,785 ± 0,112	0,918 ± 0,121	0,697 ± 0,083
	<b>CC</b>	0,957 ± 0,113	0,762 ± 0,124	0,886 ± 0,132	0,694 ± 0,082
CLDN14 rs219780	<b>CC</b>	0,980 ± 0,133 (*)	0,778 ± 0,124	0,904 ± 0,124	0,701 ± 0,085
	<b>TC</b>	0,953 ± 0,119 (*)	0,779 ± 0,113	0,911 ± 0,122	0,684 ± 0,066
	<b>TT</b>	0,888 ± 0,182 (*)	0,720 ± 0,108	0,832 ± 0,144	0,670 ± 0,087

(+) Anova  $p=0,016$ . Corrección de Bonferroni entre GG-CC  $p=0,033$ . (\*) Anova  $p=0,065$ . Resto de comparaciones no estadísticamente significativas. Datos expresados como media ± DE. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. Rad 1/3: radio distal. DMO: densidad mineral ósea

### 3. 7. Análisis complementarios

Puesto que en los SNPs 163 A/G, 245 T/G del gen *OPG* y en el rs2277438 T/G del gen *RANKL* la frecuencia del genotipo homocigoto minoritario es muy baja, hicimos el mismo estudio comparativo con la DMO pero sumando el grupo homocigoto menos frecuente y el heterocigoto y lo comparamos con el homocigoto más frecuente. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con HPP o en los sujetos control entre ambos grupos genotípicos en la DMO en ninguna de las localizaciones estudiadas.

Finalmente, en el análisis de regresión múltiple en el grupo de pacientes con HPP ninguno de los SNP estudiados parece ser un predictor de la DMO (tabla 12). Los factores que predicen una menor DMO en columna lumbar (hueso trabecular) son, por orden de magnitud de efecto: el menor IMC, el sexo femenino, la edad avanzada, y los niveles elevados de PTH. En cadera total y cuello femoral, la edad fue el principal predictor de baja DMO seguido por el menor IMC, el sexo femenino y los niveles de PTH. En radio distal, el sexo femenino fue el principal predictor de baja DMO seguido por la edad, los niveles de PTH y el menor IMC.

Tabla 12. Datos de la regresión lineal múltiple de DMO.

		Sexo	Edad	IMC	LogPTH	OPG 163 A/G	OPG 1181 G/C	RANKL rs2277438	GNAS1 393 T/C	CLDN14 Rs219780
CL DMO (g/cm <sup>2</sup> ) (R <sup>2</sup> : 0.366)	<b>β</b>	-0.183	-0.182	0.200	-0.152	-0.069	-0.109	-0.03	-0,046	-0,10
	<b>t</b>	-3.035	-3.035	3.323	-2.534	-1.143	-1.801	-0.495	-0,675	-0,144
	<b>p</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	<b>0.012</b>	0.258	0.073	0.621	0,501	0,885
1/3 Rad DMO (g/cm <sup>2</sup> ) (R <sup>2</sup> : 0.722)	<b>β</b>	-0.487	-0.395	0.117	-0.266	-0.96	0.27	-0.066	0,011	-0,049
	<b>t</b>	-7.679	-6.112	1.830	-4.2	-1.523	0.423	-1.040	0,153	-0,699
	<b>p</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.007</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.130	0.673	0.300	0,879	0,486
CadTot DMO (g/cm <sup>2</sup> ) (R <sup>2</sup> : 0.595)	<b>β</b>	-0.277	-0.388	0.376	-0.143	0.12	-0.40	-0.68	0,021	-0,95
	<b>t</b>	-5.255	-7.383	7.173	-2.708	0.236	-0.745	-1.283	0,339	-1,546
	<b>p</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.007</b>	0.814	0.457	0.201	0,735	0,124
C Fem DMO (g/cm <sup>2</sup> ) (R <sup>2</sup> : 0.576)	<b>β</b>	-0.211	-0.415	0.328	-0.137	0.049	0.002	-0.022	-0,052	0,003
	<b>t</b>	-3.86	-7.614	6.024	-2.518	0.905	0.034	-0.403	-0,847	0,050
	<b>p</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.012</b>	0.366	0.973	0.687	0,398	0,960

Sexo: 1= hombres, 2= mujeres. CL: columna lumbar. C Fem: cuello femoral. Cad Tot: cadera total. 1/3 Rad: radio distal. DMO: densidad mineral ósea. Log: logaritmo

## vi. Discusión

## 1. Estudio de la presentación del HPP

Como era de esperar, los sujetos del grupo de HPP tenían niveles bajos de DMO y niveles altos de marcadores de remodelación ósea.

La edad media al diagnóstico del grupo de HPP, 62 años, fue similar a la descrita en estudios epidemiológicos previos (Khosla *et al* 1999, Yu *et al* 2009, Wu *et al* 2010). La proporción de mujeres en nuestro estudio fue de 84,5 % siendo superior a lo descrito por Yu (entre 64 y 74,6 %), por Silverberg (Silverberg *et al* 2009): 73 %, por Khosla (Khosla *et al* 1999): 77 % y por Rubin (Rubin *et al* 2008): 78 % y por Wu (Wu *et al* 2010): 79 %. La proporción de mujeres postmenopáusicas fue de 89,5 %, superior al 71,5 % descrito por Rubin (Rubin *et al* 2008), al 73 % descrito por Silverberg (Silverberg *et al* 2009) y al 82 % de mujeres mayores de 45 años de Khosla (Khosla *et al* 1999). Esta mayor proporción de mujeres y dentro de ellas, de mujeres postmenopáusicas en comparación con la literatura disponible podría deberse a una mayor sensibilidad en nuestro medio para estudiar calcio y PTH en la osteoporosis en mujeres pasando por tanto más desapercibido el HPP en varones.

Encontramos un IMC en el rango de sobrepeso en los pacientes con HPP pero no en los sujetos control de acuerdo con estudios previos (Bolland *et al* 2005, Vignali *et al* 2009) aunque la naturaleza de esta relación no se haya establecido por ahora. Es posible que la obesidad contribuya al desarrollo del HPP mediante el déficit de vitamina D y la consiguiente estimulación autónoma y crecimiento de las glándulas paratiroides. De forma alternativa, algunos autores consideran que es el HPP el que contribuye al desarrollo de la obesidad siendo ésta una característica más del espectro clínico del HPP (Grey *et al* 1994).

En estudios sobre obesidad incluso mórbida se ha demostrado que los niveles de PTH están elevados siendo el peso el principal predictor de dichos niveles de forma independiente de los niveles de calcio o 25-OH-Vitamina D (Grethen *et al* 2011). Un mecanismo posible que puede intervenir en esta relación sería el efecto de ciertas adipocinas en la secreción de PTH como sugiere la relación positiva entre los niveles séricos de PTH y los de leptina en mujeres no obesas (Maetani *et al* 2009). En este trabajo los niveles plasmáticos de PTH y leptina estaban elevados en las mujeres con deficiencia de vitamina D y cuando se estratificó por los niveles de leptina la elevación en los niveles de PTH asociada al déficit de vitamina D se encontró predominantemente en los sujetos con niveles elevados de leptina. En aquellas mujeres con niveles bajos de leptina los niveles de PTH se mantuvieron estables a lo largo de un amplio rango de niveles plasmáticos de 25-OH-Vitamina D. Aproximadamente un 44 % de la variación de los niveles plasmáticos de PTH podría ser explicada por un modelo incluyendo los niveles plasmáticos de leptina y de 25-OH-Vitamina D con la leptina como principal contribuyente (Maetani *et al* .2009). En el estudio actual no hemos medido leptina en nuestros pacientes pero tenemos intención de continuar nuestra investigación por esta vía.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la relación que existe entre el IMC y la presentación y tamaño del adenoma en el HPP de modo que los sujetos con obesidad parecen tener niveles más elevados pre y postoperatorios que los no obesos así como adenomas mayores y una presentación clínica más sintomática. En este trabajo, la relación entre la obesidad y el crecimiento tumoral no parece estar mediada por los niveles de 25-OH-Vitamina D (Adam *et al* 2010).

La presión arterial sistólica y diastólica fue significativamente mayor en el grupo HPP que en el control, lo que contrasta con los datos aportados por Rubin (Rubin *et al* 2005) que encontraban menor TAs en un grupo reducido de HPP leve ( $126,4 \pm 16,6$  mmHg) respecto de un grupo control ( $142,7 \pm 20,0$  mmHg). Nuestros pacientes HPP tenían la TAs mayor que los

pacientes de dicho estudio. Una posible explicación a esta discordancia sería que los pacientes de nuestro estudio tenían diferentes grados de HPP y eran un grupo más numeroso en comparación con el trabajo de Rubin. En otro estudio sobre pacientes con HPP leve se describieron valores de TAs y TAd similares a los encontrados en nuestro grupo (Rao *et al* 2004). En general, el HPP incluso leve se asocia con hipertensión aunque no suele resolverse tras la cirugía curativa (Silverberg *et al* 2009). Por otra parte, nuestros sujetos control mostraban una tendencia estadísticamente no significativa hacia menor edad media que los pacientes con HPP lo que podría explicar en parte la diferencia entre las TA de ambos grupos.

No encontramos diferencias en cuando a los niveles de 25-OH-Vitamina D entre los grupos HPP y cualquiera de los grupos control (total o subgrupo con edad y sexo similar a los pacientes HPP) coincidiendo con los datos de Vignali (Vignali *et al* 2009) sobre mujeres postmenopáusicas HPP y en claro contraste con datos previos disponibles (Moosgaard *et al* 2005) que demostraban niveles menores de 25-OH-Vitamina D en pacientes con HPP respecto de sujetos control. Esta discordancia podría ser explicada porque en nuestro estudio no valoramos el factor estacional como se hizo en el estudio de Moosgaard. Encontramos niveles más elevados de todos los marcadores de remodelación ósea en los pacientes con HPP respecto de los sujetos control como se ha demostrado en otros estudios realizados previamente (Boudou *et al* 2009, Minisola *et al* 2002, Guo *et al* 2000).

En cuanto a los niveles séricos de OPG, nuestros pacientes con HPP tenían unos niveles de 4,8 pM/L (96 pg/mL) y nuestros controles totales de 2,6 pM/L (60 pg/mL) y de 3 pM/L (69 pg/mL) el subgrupo de controles con similar edad y sexo que los pacientes con HPP. En un estudio previo sobre mujeres y hombres de unos 62 años de edad con HPP, los niveles fueron la mitad de los de nuestros sujetos control y un tercio de los de nuestros pacientes con HPP. En dicho estudio los niveles de OPG sérica en los pacientes con HPP no



se modificaron después de una paratiroidectomía eficaz (Stilgren *et al* 2003). Los niveles de OPG sérica en nuestros sujetos control totales se asemejan más a los descritos por Oh (Oh *et al* 2005) en varones sanos de mediana edad (3,5 pM/L), sin embargo son aproximadamente la mitad que los descritos en mujeres postmenopáusicas con y sin osteoporosis (Mezquita-Raya *et al* 2005) y casi una tercera parte de los descritos en mujeres ancianas (Browner *et al* 2001). A pesar de que no se han establecido valores de referencia para los niveles de OPG sérica, éstos parecen estar más elevados en mujeres postmenopáusicas que en otras situaciones como puede ser el HPP.

La densidad mineral ósea medida fue menor en todas las localizaciones estudiadas en el grupo de pacientes con HPP que en el grupo control en términos absolutos y también expresada en relación con la DMO en el pico de masa ósea (T Score). En relación con la DMO de personas de similar edad y sexo (Z Score) la DMO fue menor en HPP en cuello femoral y radio distal pero no en columna lumbar y cadera total respecto al grupo control quizá debido a que en el HPP se afecta más el hueso cortical (radio distal) que el hueso trabecular (columna lumbar). En comparación con los resultados de otros autores, los datos de DXA en población italiana de HPP muy similar a la nuestra en cuanto a edad media, niveles de 25-OH-Vitamina D, niveles de calcio y de PTH son algo peores en todas las localizaciones expresados tanto como densidad mineral ósea absoluta o como T Score (Vignali *et al* 2009). En otro estudio realizado en población danesa los datos de la evaluación de la densidad mineral ósea en pacientes con HPP, tanto los que iban a ser sometidos a intervención quirúrgica como los que no iban a serlo, se expresaron como Z Score siendo inferiores los niveles en aquellos que iban a ser sometidos a intervención quirúrgica (-0,47 vs -0,15) y encontrándose los de nuestros pacientes en un tramo intermedio: -0,30.

El porcentaje de fracturas en nuestro estudio en el grupo HPP (26 %) y en el grupo control total (21,8 %) y en el subgrupo con similar edad y sexo a los pacientes HPP (21 %) es

menor que el descrito en unas poblaciones estadounidenses (Melton *et al* 1992) siendo de 36 % en HPP y 31 % en sujetos control y 49 % en HPP (Khosla *et al* 1999) y mayor que en otra población estadounidense (Wu *et al* 2010): 8,7 % en HPP y que en una población danesa (Vestergaard *et al* 2000) siendo de 20 % en HPP y de 11 % en sujetos control. En un estudio sobre prevalencia de fracturas vertebrales mediante estudio con DXA se detectó un 24,6 % de fracturas vertebrales en mujeres HPP italianas vs un 4 % en controles (Vignali *et al* 2009).

La frecuencia de litiasis renal en el grupo HPP fue de un 36 % en nuestro estudio, de un 6,8 % en el grupo control total y de un 6 % en el subgrupo de controles con edad y sexo similares a los pacientes con HPP. Estas proporciones son más elevadas que las descritas previamente en un estudio sobre población sueca en que se observó un 1 % de litiasis renal en los pacientes del grupo control y de un 25 % en el grupo de pacientes con HPP (Vestergaard *et al* 2000). En estudios norteamericanos, la frecuencia de historia de litiasis renal fue de un 15 % (Rubin *et al* 2008) y de un 7,8 % (Wu *et al* 2010). Es posible que en nuestro grupo la frecuencia de litiasis renal fuera superior porque no nos hemos limitado a registrar los datos de historia clínica sobre antecedentes de litiasis sino que se realizó estudio de imagen con ecografía en la inmensa mayoría de los pacientes diagnosticados de HPP.

## 2. Estudio genético

No encontramos diferencias en la distribución alélica entre el grupo de HPP y el grupo control lo que interpretamos en el sentido de que ninguno de los SNP estudiados sería un factor de predisposición genética para el HPP.

La distribución de los distintos genotipos en el SNP 163 A/G del gen *OPG* en nuestro estudio (AA: 70 y 74 %, AG: 24 y 28 % (controles e HPP respectivamente) y GG: 2 % en

ambos grupos) fue similar a la encontrada previamente en población coreana: AA: 82,6 y 78,5 %, AG: 15,1 y 20,2 % y GG: 1,4 y 1,3 % (Choi *et al et al* 2005 y Rhee *et al* 2006 respectivamente) y húngara AA: 75,6 %, AG: 24,6 % y GG: 2,2 % (Takacs *et al* 2010).

La distribución de genotipos en el SNP 245 T/G del gen *OPG* en nuestra población de estudio (TT: 91,6 y 90,1 %, TG: 7,6 y 9,3 % y GG: 0,4 y 0,6 % (controles e HPP respectivamente) es diferente a la de dicha población coreana (TT: 78,9 %, TG: 19,9 % y GG: 1,2 %) presentando menor frecuencia de los genotipos TT y TG y mayor de GG y similar a la descrita por Arko *et al* en 2005 en mujeres postmenopáusicas eslovacas: TT: 89 %, TG: 11 % y GG 0 %. Yamada *et al* en 2003 en mujeres japonesas encuentra la siguiente distribución: TT: 81,5 % y 77,9 %, TG: 17,8 y 20,7 %, GG: 0,7 y 1,5 % en pre y postmenopáusicas respectivamente.

La frecuencia de los distintos genotipos del SNP 1181 G/C del gen *OPG* es en nuestro estudio de GG: 26 y 27 %, GC: 47 y 50 % y CC: 27 y 30 % en controles e HPP respectivamente, siendo bastante similar a la distribución en población de mujeres caucásicas estadounidenses estudiada por Moffett *et al* en 2008: GG: 20 %, GC: 50 % y CC: 30 %. En mujeres eslovacas postmenopáusicas (Arko *et al* 2005) la distribución genotípica es similar con mayor frecuencia de los heterocigotos: GG 18,5 %, GC 57 % y CC: 24,5 %. En mujeres chinas postmenopáusicas (Zhao *et al* 2005) la frecuencia de genotipos fue diferente a la mencionada previamente con menor frecuencia del alelo C: GG: 56,6 %, GC: 34,6 % y CC: 8,8 % de forma similar a las mujeres coreanas postmenopáusicas (Choi *et al* 2005): GG: 51 %, GC: 40,5 % y CC: 8,4 %. En mujeres irlandesas (Wynne *et al* 2002) se da una distribución intermedia: GG: 46 % y 35 %, GC: 43 y 52 %, CC: 11 y 13 % en pre y postmenopáusicas respectivamente.

La frecuencia de los distintos genotipos del SNP rs2277438 del gen *RANKL* en nuestro estudio es similar a la descrita por Dong (Dong *et al* 2009) en población

estadounidense, AA: 66,5 %, AG: 30,7% y GG: 2,7% pero en los dos estudios sobre población oriental Kim (Kim *et al* 2007) en mujeres coreanas y Hsu (Hsu *et al* 2006) en varones chinos, la proporción de los homocigotos GG es mayor 15 y 6 % en detrimento del número de homocigotos AA: 43 y 40 % respectivamente

La frecuencia de los distintos genotipos del SNP 393 T/C del gen *GNAS1* en nuestro estudio es similar a la descrita por todos los autores previos tanto en sujetos control como en pacientes de distintos tipos de cáncer, migraña o hipertiroidismo por Enfermedad de Graves-Basedow siendo todos ellos sobre población europea (Frey *et al* 2005, Oterino *et al* 2006, Otterbach *et al* 2006, Bachmann *et al* 2007, Kaderi *et al* 2007, Lehnerdt *et al* 2008, Glowacka *et al* 2009).

En cuanto a la relación entre la DMO o las fracturas óseas y los SNPs estudiados, encontramos valores inferiores estadísticamente significativos de DMO en radio distal, con niveles similares de PTH en el grupo de HPP homocigotos para el alelo menor (GG) en comparación con los heterocigotos y homocigotos para el alelo mayor para los SNP 163 A/G y 245 T/G del gen *OPG* que como ya hemos dicho se encuentran en desequilibrio de ligamiento. En el grupo de sujetos controles, esta diferencia en valores de DMO entre grupos alélicos no existe. Esta diferencia podría significar que los sujetos con HPP homocigotos para el alelo G en los SNPs mencionados sufren de una mayor pérdida de DMO específicamente cortical no dependiente de PTH. La asociación entre el genotipo GG del SNP 163 A/G del gen *OPG* y baja DMO en antebrazo, baja atenuación por ultrasonidos y baja velocidad de sonido en talón ya ha sido descrita en una población de mujeres danesa (Jorgensen *et al* 2004). En cadera, Takács *et al* en 2010 describió una menor DMO en cadera asociada al genotipo GG del SNP 163 A/G del gen *OPG* en mujeres postmenopáusicas húngaras. De forma discordante, Hsu *et al* en 2006 encontró que los sujetos chinos varones con el genotipo GG del SNP 163 A/G del gen *OPG* tenían un riesgo un 70 % menor de tener DMO

extremadamente baja en la cadera. Yamada *et al* en 2003 encontró en mujeres japonesas postmenopáusicas con el genotipo GG del SNP 245 T/G del gen de *OPG* una menor DMO en radio, cuello femoral y corporal total pero esta asociación no se encontró en mujeres premenopáusicas ni en varones. Langdahl *et al* en 2002 en población danesa encontró mayor frecuencia del alelo G en los sujetos con osteoporosis. Kim *et al* en 2007 en su estudio sobre mujeres coreanas no encontró asociación entre la DMO y los SNPs 163 A/G y 245 T/G del gen *OPG*. Jurado *et al* en 2010 en mujeres españolas postmenopáusicas y Ueland *et al* en 2007 en mujeres ancianas australianas no encontraron asociación entre la DMO o fracturas y el SNP 163 A/G del gen *OPG*. Arko *et al* en 2005 no encontró asociación entre el SNP 245 T/G del gen *OPG* y la DMO en mujeres postmenopáusicas eslovacas. Choi *et al* en 2005 no encontró relación entre el SNP 163 A/G del gen *OPG* y la DMO en radio distal o calcáneo.

No encontramos ninguna diferencia entre genotipos en el SNP 1181 G/C del gen *OPG* en cuanto a DMO en los sujetos con HPP al igual que Jurado *et al* (2010) en mujeres españolas postmenopáusicas y que Ueland *et al* (2007) en mujeres ancianas australianas. Sin embargo, en los sujetos control sí encontramos mayor DMO en columna lumbar en el grupo genotípico CC respecto del GG en concordancia con hallazgos previos en población general o en mujeres con osteoporosis postmenopáusica (Langdahl *et al* 2002, Arko *et al* 2005, Zhao *et al* 2005, Choi *et al* 2005, Kim *et al* 2001, García-Unzueta *et al* 2008, Moffett *et al* 2008). Moffett describió una DMO un 2 % inferior en región intertrocanterea en mujeres caucásicas estadounidenses con el genotipo GG respecto del CC. En columna lumbar esta diferencia fue de un 3,7 %. El riesgo de fracturas fue un 26 % mayor en cadera en las mujeres con genotipo CC y un 51 % mayor en cuello femoral. Kim *et al* describió una DMO un 8,8 % superior en columna lumbar en las mujeres coreanas con genotipo CC respecto de los grupos GC y GG. Zhao *et al* en 2005 en mujeres chinas postmenopáusicas encontró una DMO entre un 9,5 y un 12,6 % superior en columna lumbar en el grupo con genotipo CC

respecto de los genotipos GC y GG respectivamente. Arko *et al* en 2005 describe una DMO inferior en columna lumbar en el grupo GG respecto del CC en mujeres postmenopáusicas eslovenas. Choi *et al* en 2005 en mujeres postmenopáusicas coreanas encontró una DMO un 7 % superior en radio distal y un 10 % en calcáneo en el genotipo CC respecto del GG. Hsu *et al* en 2006 no encontró asociación entre el SNP 1181 G/C del gen *OPG* y la DMO en población de hombres y mujeres pre y postmenopáusicas en China. De manera discordante Wynne *et al* en 2002, describió que la presencia de uno o mas alelos C en posición 1181 en mujeres postmenopausicas irlandesas se asocia de forma no significativa con un 14 % menor DMO en columna lumbar y cadera. Langdahl *et al* en 2002 encontró el alelo C con menor frecuencia en sujetos con osteoporosis y una relación entre dicho alelo y mayor DMO en columna lumbar en población danesa. Nuestro grupo de investigación (García-Unzueta *et al* 2008) estudió este polimorfismo en mujeres y mostró que el genotipo CC era más frecuente en las mujeres que no presentaban osteoporosis que en las que la presentaban y además se asociaba con una DMO un 10% mayor en columna lumbar en el grupo de mujeres premenopáusicas. En el grupo de mujeres postmenopáusicas aparecía la misma tendencia pero no alcanzaba diferencia estadística.

Las diferencias en la asociación entre el alelo C y la DMO en sujetos sin HPP y la ausencia de esta asociación en los sujetos con HPP podría significar que la pérdida ósea en el HPP, fundamentalmente cortical, y en la osteoporosis, principalmente trabecular, están moduladas por factores genéticos diferentes. Algunos de dichos factores podrían ser el alelo G del SNP 1181 G/C del gen *OPG* que favorecería la pérdida ósea en columna lumbar en la osteoporosis o el alelo G en los SNPs 245 T/G y 163 A/G del gen *OPG* que favorecerían la pérdida de hueso cortical en el HPP.

De acuerdo con otros trabajos previos en población no HPP (Hsu *et al* 2006, Kim *et al* 2007) no hemos encontrado ninguna diferencia significativa entre los genotipos del SNP

rs2277438 del gen *RANKL* en ninguno de los dos grupos de estudio: HPP y control. Sin embargo, sí encontramos una tendencia estadísticamente no significativa en el genotipo GG respecto de los grupos AA y AG hacia niveles mayores de FAo, niveles menores de DMO en el tercio distal del radio y hacia niveles menores de DMO en cadera total, datos que guardan cierta coherencia entre sí a pesar de ir en sentido contrario a lo descrito por Dong *et al* en 2009 en población estadounidense: relación entre el haplotipo GG del SNP rs2277438 del gen *RANKL* y un mayor índice de resistencia a la compresión en cuello femoral calculado a partir de la DMO por DXA.

En el estudio del polimorfismo T/C 393 del gen *GNAS1* encontramos una tendencia estadísticamente no significativa en el grupo genotípico CC respecto del resto de grupos genotípicos hacia mayores niveles de PTH, calcio iónico, P1NP, Crosslaps  $\beta$  y osteocalcina en pacientes con hiperparatiroidismo primario y hacia menor DMO en todas las localizaciones estudiadas excepto en tercio distal del radio tanto en pacientes como en sujetos control. Hasta el momento no disponemos de ningún estudio sobre este SNP y su relación con las fracturas o densidad ósea con el que poder realizar cualquier tipo de comparación. Los estudios realizados hasta ahora que han estudiado este SNP lo han relacionado con distintas enfermedades como la migraña (Oterino *et al* 2006) en que el genotipo CC se relaciona con mayor frecuencia de padecerla. También se ha descrito que los pacientes con genotipo TT tienen un peor resultado tras una artroplastia total de cadera (Bachmann *et al* 2008) y mayor frecuencia de recurrencia de enfermedad de hipertiroidismo por enfermedad de Graves-Basedow (Glowacka *et al* 2009). El resto de estudios ha sido realizado sobre distintos tipos de tumores. En pacientes afectados de colangiocarcinoma los homocigotos TT presentan una mayor tasa de proliferación celular y menor de apoptosis (Schmitz *et al* 2007) mientras que en tumor de vejiga, carcinoma renal de células claras, en leucemia crónica linfocítica y en cáncer de laringe este mismo genotipo confiere una evolución más favorable (Frey *et al* 2005,

Frey *et al* 2006, Lehnerdt *et al* 2008). Otro estudio sobre leucemia crónica linfocítica no mostró asociación entre este SNP y el curso clínico (Kaderi *et al* 2008).

En el estudio del polimorfismo rs219780 del gen de Claudina 14 encontramos una tendencia estadísticamente no significativa hacia niveles menores de calcio iónico, PTH, fosfatasa alcalina ósea, Crosslaps  $\beta$  y osteocalcina en el grupo genotípico TT respecto del resto de grupos en los pacientes con HPP, lo que podría indicar una menor expresión de la enfermedad en dichos individuos. No hemos encontrado ninguna diferencia entre los distintos haplotipos en relación con la DMO en los sujetos con HPP. En contraste con lo descrito por Thorleifsson *et al* 2009, que encontró que el alelo C confería un riesgo de baja DMO en cadera y columna lumbar en mujeres, nosotros hemos hallado una tendencia hacia mayor DMO en todas las localizaciones en los sujetos control con genotipo CC respecto de los TT y de los heterocigotos especialmente en columna lumbar. En el estudio de Thorleifsson el alelo C además de a baja DMO se asociaba a litiasis renal.

La principal limitación de este estudio es la baja frecuencia del genotipo GG en los SNP 163 A/G y 245 T/G del gen *OPG* siendo los únicos SNP sobre los que hemos encontrado resultados positivos en los pacientes HPP. A pesar de esta limitación, nuestros resultados son coherentes en el sentido en que no se reproducen en los sujetos control y en que ambos SNP están localizados en el mismo bloque haplotípico (promotor). En la actualidad estamos intentando entrar en contacto con algún grupo de investigación con interés y capacidad para estudiar la genética del HPP y poder aumentar así el número de sujetos de forma significativa.

Otra limitación importante es que no hemos realizado un estudio funcional complementario aunque también estamos trabajando en ello.



## vii. Conclusiones

1. Nuestro trabajo proporciona la primera evaluación de la relación entre SNP de genes del sistema OPG/RANK/RANKL además de *GNAS1* y *CLDN14* y el HPP esporádico.

2. El grupo de pacientes con HPP, objeto principal de este estudio, tenía una edad media al diagnóstico de 62 años, con una distribución por sexos con predominio de mujeres en proporción 5,6/1 y con un IMC medio correspondiente a sobrepeso.

3. Los pacientes con HPP presentaban mayor frecuencia de litiasis renal que la población control.

4. Los niveles de 25-OH-Vitamina D medios observados en los pacientes con HPP son considerados como deficitarios. Estos pacientes tenían niveles aumentados de los marcadores de remodelación ósea y niveles menores de densidad mineral ósea en las tres

localizaciones estudiadas y mayor frecuencia de fracturas óseas en comparación con la población control.

5. La gran mayoría de los pacientes con HPP se mostraban asintomáticos en el momento del diagnóstico siendo realizado éste por una detección casual de hipercalcemia y posterior confirmación con niveles elevados de PTH.

6. La distribución de los distintos SNP de todos los genes estudiados no fue diferente entre los pacientes con HPP y los sujetos control

7. No se demostró correlación entre ninguno de los SNP de los genes estudiados y las fracturas óseas o la litiasis renal en pacientes con HPP o en sujetos control

8. Los sujetos con HPP y genotipo GG para los SNPs 163 A/G y 245 T/G del gen *OPG* parecen tener un mayor riesgo de presentar una DMO menor en radio distal, fundamentalmente hueso cortical, por un mecanismo no dependiente de los niveles de PTH aunque el bajo número de pacientes exige que este dato se confirme. En cualquier caso, la baja frecuencia de este alelo resta importancia clínica al hallazgo.

9. En los sujetos control, pero no en los pacientes con HPP, encontramos mayor DMO en columna lumbar en el grupo genotípico CC respecto del GG del SNP 1181 G/C del gen *OPG* en concordancia con hallazgos previos en población general o en mujeres con osteoporosis postmenopáusica lo que podría significar que la pérdida ósea en el HPP, fundamentalmente cortical, y en la osteoporosis, principalmente trabecular, están moduladas por factores genéticos diferentes.

10. Encontramos una tendencia estadísticamente no significativa hacia niveles menores de DMO en el tercio distal del radio y en cadera total en los pacientes HPP con genotipo GG respecto de los sujetos AA y de los heterocigotos para el SNP rs2277438 del gen *RANKL*.

11. Encontramos en el grupo genotípico CC del SNP 393 T/C de *GNAS1* en los pacientes con HPP una tendencia estadísticamente no significativa hacia mayores niveles de PTH, calcio iónico, Crosslaps  $\beta$  y osteocalcina. En ambos grupos HPP y control existe la misma tendencia estadísticamente no significativa hacia menor DMO en el grupo genotípico CC respecto de los otros dos grupos en todas las localizaciones excepto en tercio distal del radio.

12. No encontramos ninguna diferencia en los niveles de DMO entre los distintos grupos genotípicos en los pacientes con HPP en el estudio del SNP 219780 del gen *CLDN14* mientras que en el grupo control existe una tendencia hacia niveles mayores de DMO en el grupo genotípico CC respecto de los otros dos grupos en todas las localizaciones, especialmente en columna lumbar.

13. Dada la baja frecuencia del alelo menor en los SNPs 163 A/G y 245 T/G del gen *OPG*, sería necesario ampliar el estudio realizándolo en poblaciones más numerosas de HPP además de hacer evaluación complementaria funcional para apoyar estos resultados positivos.

## viii. Bibliografía

- Abrams S.A. Normal Acquisition and loss of bone mass. *Hormone Research* 2003; 60: 71-76
- Adam M.A., Untch B.R., Danko M.E. et al. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010; 95: 4917-4924
- Adami S., Braga V., Squaranti R. et al. Bone measurements in asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Bone* 1998; 22: 565-570
- Alexeeva L., Burkhardt P., Christiansen C. et al. WHO Study Group on: Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. *World Health Organ Technical Report Series* 1994; 843: 1-129

- Alvarado R., Meyer-Rochow G., Sywak M. et al. Bilateral internal jugular venous sampling for parathyroid hormone determination in patients with nonlocalizing primary hyperparathyroidism. *World Journal of Surgery* 2010; 34: 1299-1303
- Al Zahrani, Michael A Levine. Primary hyperparathyroidism. *The Lancet* 1997; 349: 1233-1238
- Angelow S., Ahlstrom R., Yu A.S.L. Biology of Claudins. *American Journal of Renal Physiology* 2008; 295: 867-876
- Arko B., Prezelj J., Komel R. et al. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 4080-4084
- Arko B. Prezelj J., Kocijancic A. et al. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 51: 270-279
- Arnett T. Estructura y remodelación del hueso. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004; 1: 1-6
- Aspinall R., Boase S., Malycha P. Long-term symptom relief from primary hyperparathyroidism following minimally invasive parathyroidectomy. *World Journal of Surgery* 2010; 34: 2223-2227

- Bachmann H.S., Hanenkamp S., Kornacki B.I. et al. Gender-dependent association of the *GNAS1* T393C polymorphism with early aseptic loosening after total hip arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Research*; 2008; 26: 1562-68
- Baron R. and Rawadi G. Minireview: Targeting the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007; 148: 2635-2643
- Bastepe M., Lane A.H., Jüppner H. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q- and the resulting changes in *GNAS1* methylation- as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *American Journal of Human Genetics* 2001; 68: 1283-1289
- Bauer D.C., Black D.M., Garnero P. et al. Change in bone turnover and hip, non-spine and vertebral fracture in alendronate-treated women: the fracture intervention trial. *The Journal of Bone and Mineral Research* 2004, 19: 1250-1258
- Bergmann P., Body J.-J., Boonen S. et al. Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *The International Journal of Clinical Practice* 2009, 63: 19-26
- Bilezikian J.P., Potts, J.T., El-Hajj Fuleihan G. et al. Summary statement from a Workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21<sup>st</sup> century. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, 87: 5353-5361

- Bilezikian J.P., Brandi M.L., Rubin M. et al. Primary hiperparathyroidism: new concepts in clinical densitometric and biochemical features. *Journal of internal medicine* 2005; 257: 6-17
  
- Bilezikian J. P., Khan A. A., Potts J.T. on behalf of the third international workshop on the management of asymptomatic primary hyperthyroidism. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the third international workshop. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 335-339
  
- Bolland M.J., Grey A.B., Gamble G.D. et al. Association between Primary Hyperparathyroidism and Increased Body Weight: A Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 1525–1530
  
- Bollerslev J., Jansson S., Mollerup C.L. et al, on behalf on the SIPH Study Group. Medical observation, compared with parathyroidectomy, for asymptomatic primary hyperparathyroidism: a prospective, randomized trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 1687-1692
  
- Boudou P., Ibrahim F., Cornier C. et al. Potential utility of high preoperative levels of serum type I collagen markers in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism with respect to their short-term variations after parathyroidectomy. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009; 27: 240-246

- Bringhurst F.R., Demay M.B., Kronenberg H.M. Hormonas y alteraciones del metabolismo mineral. En: Williams. Textbook of Endocrinology. Editorial Elsevier. 2009; 27: 1215-1279
- Brockstedt H., Christiansen P., Mosekilde L. et al. Reconstruction of cortical bone remodeling in untreated primary hyperparathyroidism and following surgery. Bone 1995;16: 109-117
- Brown E.M., Pollack M., Hebert S.C. The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease. Annual Reviews of Medicine 1998; 49: 15-29
- Browner W. S., Lui L.-Y., Cummings S.R. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures and mortality in elderly women. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2001, 86: 631-637
- Cappelli C., Pelizzari G., Pirola K. et al. Modified percutaneous ethanol injection of parathyroid adenoma in primary hyperparathyroidism. Q. J. Med 2008, 101: 657-662
- Carling T., Kindmark A., Hellman P. et al. Vitamin D receptor (VDR) genotypes in primary hyperparathyroidism. Nature Medicine 1995; 1:1309-1311
- Casanova D. Cirugía mínimamente invasiva de tiroides y paratiroides. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 2005; 28 suplemento 3



- Cavallaro G., Cucina A., Coluccia P. et al. Role of growth factors on human parathyroid adenoma cell proliferation. *World Journal of Surgery* 2010; 34: 48-54
- Chang W., Shoback D. Extracellular Ca<sup>2+</sup> -sensing receptors—an overview. *Cell Calcium* 2004; 35: 183-196
- Chen P., Satterwhite J. H., Licata A. A. et al. Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20: 962-970
- Choi J. Y., Shin A., Park S.K. et al. Genetic Polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1, and Bone Mineral Density in Korean Postmenopausal Women. *Calcified Tissue International* 2005; 77: 152-159
- Collins M.T. et Boehm M. It ANKH necessarily so. *The Journal of Clinical of Endocrinology and Metabolism* 2011; 96:72-74
- Cormier C., Souberbielle J.C., Kahan A. Primary hyperparathyroidism and osteoporosis in 2004. *Joint Bone Spine* 2004; 71: 183-189
- Cundy T., Hedge M., Naot D. et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Human Molecular Genetics* 2002; 11: 2119-2127.

- Daroszevska A., Hocking L.J., McGuigan F. et al. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 19: 1506-1511
- De Sanctis L., Romagnolo D., Olivero M. et al. Molecular analysis of the GNAS1 gene for the correct diagnosis of Albright hereditary osteodystrophy and pseudohypoparathyroidism. *Pediatric Research* 2003; 53: 749-755
- Delmas P.D., Eastell R., Garnero P. et al for the Committee of Scientific advisors of the international osteoporosis foundation. *Osteoporosis International* 2000; 6:S2-17
- Dempster D.W., Müller R., Zhou H. et al. Preserved Three-dimensional cancellous bone structure in mild primary hyperparathyroidism. *Bone* 2007; 41: 19-24
- Dempster D.W., Parisien M., Silverberg S.J. et al. On the mechanism of cancellous bone preservation in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84:1562-1566
- Ding C., Parameswaran V., Udayan R. et al. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 1952-1958

- Dong S.-S. Liu X.-G. Chen Y. et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcified Tissue International* 2009; 85: 104-112
- Eastell R., Barton I., Hannon R.A. et al Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; 18: 1051-1056
- Eastell R., Arnold A., Brandi M.L. et al. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 340-350
- Farahnak P., Ring M., Caidahl K. et al. Cardiac function in mild primary hyperparathyroidism and the outcome after parathyroidectomy. *European Journal of Endocrinology* 2010; 163: 461-467
- Freson K., Thygesen C., Wittevrongel C. et al. Pseudohypoparathyroidism type Ib with disturbed imprinting in the GNAS1 cluster and G<sub>s</sub>α deficiency in platelets. *Human Molecular Genetics* 2002; 11: 2741-2750
- Frey U.H., Eisenhardt A., Lümmen G. et al. The T393C polymorphism of the Gas gene (*GNAS1*) is a novel prognostic marker in bladder cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2005; 14: 871-877

- Frey U.H., Nüchel H., Sellme L. et al. The GNAS1 T393C polymorphism is associated with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 5686-5692
- Frey U. H., Lümmen G.I., Jäger T. et al. The GNAS1 polymorphism predicts survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 759-763
- García-Unzueta M.T. Determinaciones analíticas: calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, parathormona, vitamina D. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpuyo editores 2004; 12: 59-64.
- García-Unzueta M.T., Riancho J.A., Zarrabeitia M.T. et al. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Hormone and Metabolism Research* 2008; 40: 219-24.
- Garnero P. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk. *Osteoporosis international* 2000; 6:S55-65
- Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management. *Molecular Diagnosis and Therapy* 2008; 12: 157-170
- Georgitsi M. MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27<sup>Kip1</sup> and p18<sup>INK4C</sup>) mutations. *Best practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010; 24: 425-437

- Glowacka D., Loesch C., Johnson K.T.M. et al. The T393C polymorphism of the Gas gene (*GNAS1*) is associated with the course of Graves' Disease. *Hormone and Metabolism Research* 2009; 41: 430-435
- Golledge J., Biroš E., Clancy P. et al. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding osteoprotegerin is associated with diastolic blood pressure in older men. *American Journal of Hypertension* 2009; 22: 1167-1170
- Grethen E., McClintock R., Gupta C.E. et al. Vitamin D and hyperparathyroidism in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96: 1320-1326
- Grey A.B., Evans M.C. Stapleton J.P. et al. Body weight and bone mineral density in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Annals of Internal Medicine* 1994; 121: 745-749
- Gutiérrez G. Regulación paracrina del hueso. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004; 3: 13-18.
- Guo C.-Y., Holland P.A., Jackson B.F. et al. Immediate changes in biochemical markers of bone turnover and circulating interleukin-6 after parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2000; 142: 451-459

- Hagström E., Hellman P., Larsson T.E. et al. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation* 2009; 119: 2765-2771
- Herrmann M., Seibel M. The amino- and carboxiterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review. *Clinica Chimica Acta* 2008; 393: 57-75
- Heyliger A., Tangpricha V., Weber C. et al. Parathyroidectomy decreases systolic and diastolic blood pressure in hypertensive patients with primary hyperparathyroidism. *Surgery* 2009; 146: 1042-1047
- Hofbauer L. C., Heufelder A. E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2355-2363
- Hofbauer L.C., Schoppet M. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 4078-4079.
- Hofer A.M., Brown E.M. Extracellular calcium sensing and signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biololy* 2003; 4: 530—538

- Hollis B.W. Circulating 25-Hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *The Journal of Nutrition* 2005; 135: 317-322
- Hsu Y.-H., Niu T., Terwedow H.A. et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodelling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Human Genetics* 2006; 118: 568-577.
- Huang J.C., Sakata T., Pflieger L. et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004, 19: 235-244
- Ivaska K.K., Lenora J., Gerdhem P. et al. Serial assessment of serum bone metabolism markers identifies women with the highest rate of bone loss and osteoporosis risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 2622-2632
- Jorgensen H.L., Kusk P., Madsen B.F. et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 22: 132-138
- Joseph F., Chan B.Y., Durham B.H. et al. The circadian rhythm of osteoprotegerin and its association with parathyroid hormone secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 3230-3238

- Jurado S., Nogues X., Agueda L. et al. Polymorphisms and haplotypes across the osteoprotegerin gene associated with bone mineral density and osteoporotic fractures. *Osteoporosis International* 2010; 21: 287–296
- Kaderi M.A., Murray F., Jansson M. et al. The GNAS1 T393C polymorphism and lack of clinical prognostic value in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2008; 32: 984-987
- Kapur K., Johnson T., Beckman N.D. et al. Genome-wide meta-analysis for serum calcium identifies significantly associated SNPs near the Calcium-Sensing Receptor (CASR) gene. *PLOS genetics* 2010; 6: e1001035.
- Khan A., Grey A., Shoback D. Medical management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 373-381
- Khosla S., Melton III L.J., Wermers R.A. et al. Primary hyperparathyroidism and the risk of fracture: a population-based study. *The Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14: 1700-1707
- Khosla S., Arrighi M., Melton L.J. et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporosis International* 2002; 13: 394-399
- Kim J.G., Kim J.H., Kim J.Y. et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene



- polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007, 14: 913-918
- Kotvacheva R.D., Vlahov J.D., Shinkov A.D. et al. High-intensity focused ultrasound to treat primary hyperparathyroidism: a feasibility study in four patients. *American Journal of Roentgenology* 2010; 195: 830-835
  - Kraenzlin M.E. Biochemical markers of bone turnover and osteoporosis management. *BoneKEy* 2007; 4: 191-203
  - Lacey D.L., Timms E., Tan H.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-76
  - Lalande M. Imprints of disease at GNAS1. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 793-794
  - Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L. et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002, 17: 1245-1255
  - Larsson K., Ljunghall S., Krusemo U.B. et al. The risk of hip fractures in patients with primary hyperparathyroidism: a population-based cohort study with a follow-up of 19 years. *Journal of international Medicine* 1993; 234: 585-593

- Lehnerdt G.F., Franz P., Winterhoff S. et al. The *GNAS1* T393C polymorphism predicts survival in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2008; 118: 2172-2176
- Lenora J., Gerdhem P., Obrant K.J. et al. Bone turnover markers are correlated with quantitative ultrasound of the calcaneus: 5-year longitudinal data. *Osteoporosis international* 2009, 20: 1225-1232
- Lew J.I., Rivera M., Irvin G.L. III. et al. Operative failure in the era of focused parathyroidectomy. *Archives of Surgery* 2010, 145: 628-633
- Li X., Commane N., Jiang Z et al. IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A* 2001; 98: 4461-4465
- Linglart A., Carel J. C., Garabédian M. et al. *GNAS1* lesions in pseudohypoparathyroidism Ia and Ic: genotype phenotype relationship and evidence of the maternal transmission of the hormonal resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 189-197
- Locklin R., Khosla S., Turner R. et al. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent an continuously administered parathyroid hormone. *Journal of cellular biochemistry* 2003; 89: 180-190

- Lowe H., McMahon D., Rubin M.R. et al. Normocalcemic primary hyperparathyroidism: further characterization of a new clinical phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 3001-3005
- Lundgren E., Rastad J. Thruftell E. et al. Population-based screening for primary hyperparathyroidism with serum calcium and parathyroid hormone values in menopausal women. *Surgery* 1997; 121: 287-294
- Maetani M., Maskarinec G., Franke A.A. et al. Association of leptin, 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone in women. *Nutrition and Cancer* 2009; 61: 225-231
- Malik M.H., Bayat A., Jury F. et al. Genetic susceptibility to hip arthroplasty failure-association with the RANK-OPG pathway. *International Orthopaedics* 2006; 30: 177-81
- Malouf J., Laiz A. M., Farrerons J. Radiología de las enfermedades metabólicas óseas. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004, 15: 77-82.
- Mariani G., Gulec S.A., Rubello D. et al. Preoperative localization and radioguided parathyroid surgery. *Journal of Nuclear Medicine* 2003; 44: 1443-1458
- Melton III L. J., Atkinson E. J., O'Fallon W. et al. Risk of age-related fractures in patients with primary hyperparathyroidism. *Bone and Mineral* 2002; 17:N98-102

- Mezquita P., Muñoz-Torres M., Alonso G. Otras hormonas: hormonas tiroideas, GH, glucocorticoides. En: Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Jarpyo editores 2004, 9: 45-48
- Mezquita-Raya P., de la Higuera M., Fernández D. et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. Osteoporosis International 2005, 16: 1368-1374
- Minisola S., Dionisi S., Pacitti M.T. et al. Gender differences in serum markers of bone resorption in healthy subjects and patients with disorders affecting bone. Osteoporosis International 2002; 13: 171-175
- Moffett S.P., Oakley J.A., Cauley L.Y. and Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoprotegerin Lys3Asn Polymorphism and the Risk of Fracture in Older Women. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2008; 93: 2002-2008
- Moosgaard B., Vestergaard P., Heickendorff L. et al. Vitamin D status, seasonal variations, parathyroid adenoma weight and bone mineral density in primary hyperparathyroidism. Clinical Endocrinology 2005; 63: 506-513
- Morinaga T., Nakagawa N., Yasuda H. et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. European Journal of Biochemistry 1998; 254: 685-691.

- Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism and the skeleton. *Clinical Endocrinology* 2008; 69: 1-19
- Nakchbandi I., Lang R., Kinder B. et al. The role of the receptor activator of nuclear factor KB ligand/osteoprotegerin cytokine system in primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 967-973
- Navarro L., Blázquez J.A., del Pino J. et al. Utilidad clínica de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea en la mujer postmenopáusica reciente: estudio longitudinal a 2 años. *Medicina Clínica* 2008; 131:333-338
- Odvina C., Sakhaee K., Heller H. et al. Biochemical characterization of primary hyperparathyroidism with and without kidney stones. *Urological Research* 2007; 35: 123-128
- Oh K.W., Rhee E.J. Lee W.Y. et al. Circulating osteoprotegerin levels and receptor activator of NF-κB ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males. *Clinical Endocrinology* 2005; 62: 92-98
- Ohmori H., Makita Y., Funamizu M. et al. Linkage and association analyses of the OPG gene locus with human osteoporosis. *Japan Human Genetics* 2002; 47: 400-406.

- Orr-Walker B.J., Evans M.C., Clearwater J.M. et al. Effects of hormone replacement therapy on bone mineral density in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Archives of Internal Medicine* 2000; 160: 2161-2166
- Oterino A., Ruiz-Alegría C., Castillo J. et al. *GNAS1* T393C polymorphism is associated with migraine. *Cephalalgia* 2007; 27: 429-434
- Otterbach F., Callies R., Frey U.H. et al. The T393C polymorphism in the gene *GNAS1* of G protein is associated with survival of patients with invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Research Treatment* 2007; 105: 311-317
- Pasiaka J.L., Parsons L. and Jones J. The long-term benefit of parathyroidectomy in primary hyperparathyroidism: a 10-year prospective surgical outcome study. *Surgery* 2009; 146:1006-1013
- Paternoster L., Ohlsson C., Sayers L. et al. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon Longitudinal Study of Parents and Children and Gothenburg Osteoporosis and Obesity Determinants cohorts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010; 95, 3940-3948
- Paternoster L., Lorentzon M., Vandenput L. et al. Genome-Wide association meta-analysis of cortical bone mineral density unravels allelic heterogeneity at the RANKL locus and potential pleiotropic effects on bone. *PLoS Genetics* 2010; 6: e1001217

- Peacock M., Bilezikian J.P., Klassen P.S. et al. Cinacalcet hydrochloride maintains long-term normocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 135-141
- Peacock M., Bolognese M.A., Borofsky M.A. et al. Cinacalcet treatment of primary hyperparathyroidism: biochemical and bone densitometric outcomes in a five-year study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 4860-4867
- Peacock M., Bilezikian J.P., Bolognese M.A. et al. Cinacalcet HCl reduces hypercalcemia in primary hyperparathyroidism across a wide spectrum of disease severity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96: E9-18
- Persson A., Bollerslev J., Rosen T. et al. Effect of surgery on cardiac structure and function in mild primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology* 2010; 74: 174-80
- Rao D.S., Phillips E.R., Divine G. et al. Randomized controlled clinical trial of surgery versus no surgery in patients with mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 5415-5422
- Reppe S., Stilgren L., Olstad O.K. et al. Gene expression profiles give insight into the molecular pathology of bone in primary hyperparathyroidism. *Bone* 2006; 39: 189-198

- Rhee E.J., Oh K.W., Jung C.H. et al. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. *Clinical Endocrinology* 2006; 64: 689-697
- Riancho J.A. Hormonas sexuales. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004; 8: 41-44.
- Richards J.B., Rivadeneira F., Intuye M. et al. Bone mineral density, osteoporosis and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *The Lancet* 2008; 371: 1505-12
- Rio del, L. Densitometría ósea. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004; 16: 83-87
- Rosen C. J. Vitamin D insufficiency. *The New England Journal of Medicine* 2011; 364: 248-254
- Ross A.C., Manson J.E., Abrams S.A. et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96: 53-58



- Rubin M.A., Lee K.H., McMahon D.J. et al. Raloxifene lowers serum calcium and markers of bone turnover in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 1174-1178.
- Rubin M.R. Maurer M.S., McMahon D.J. et al. Arterial stiffness in mild primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 3326-3330
- Rubin M. R., Bilezikian J. P., McMahon D. J. et al. The natural history of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery after 15 years. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008, 93: 3462-3470
- Sankaran S., Gamble G., Bolland M. et al. Skeletal effects of interventions in mild primary hyperparathyroidism: a meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010; 95: 1653-1662
- Schmitz K. J., Lang H., Frey Y. H. et al. GNAS1 T393C polymorphism is associated with clinical course in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Neoplasia* 2007; 9: 159-165
- Seibel M. J. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis International* 2000; 6:S18-29

- Shiga T., Tsuji Y., Fujioka M. et al. T. Risk factors for hip fracture in Japanese elderly women with osteoporosis: Applicability of biochemical markers in bone turnover. *Geriatrics and Gerontology International* 2009; 9: 69-74
- Siilin H., Rastad J., Ljunggren Ö. et al. Disturbances of calcium homeostasis consistent with mild hyperparathyroidism in premenopausal women and associated morbidity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 47-53
- Siilin H., Lundgren E., Mallmin H. et al. Prevalence of primary hyperparathyroidism and impact on bone mineral density in elderly men: MrOs Sweden. *World Journal of Surgery* 2011; 35: 1266-1272
- Silverberg S.J., Shane E., De la Cruz L. et al. Skeletal disease in primary hyperparathyroidism. *Journal of bone and mineral research* 1989; 4: 283-291
- Silverberg S.J., Shane E., Dempster et al. The effects of Vitamin D insufficiency in patients with primary hyperparathyroidism. *American Journal of Medicine* 1999; 107: 561-567
- Silverberg S.J., Shane E., Jacobs T.P. et al. A 10 year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1249-1255

- Silverberg S.H., Lewiecki E.M., Mosekilde L. et al. Presentation of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2009; 94: 351-365
- Singer R. and Eyre D. R. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. Cleveland Clinic Journal of Medicine 2008; 75: 739-750
- Soedarsono N., Rabello D., Kamei H. et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. Journal of Periodontal Research 2006; 41: 397-404
- Sornay-Rendu E., Munoz F., Garnero P. et al. Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study. Journal of Bone and Mineral Research 2005; 20: 1813-1819
- Stein E.M., Dempster D.W., Udesky J. et al. Vitamin D deficiency influences histomorphometric features of bone in primary hyperparathyroidism. Bone 2010; 48: 557-61
- Steiniche T., Christiansen P., Vesterby A. et al. Primary hyperparathyroidism: bone structure, balance and remodeling before and 3 years after surgical treatment. Bone 2000; 26: 535-543

- Stilgren L.S., Hegedüs L.M., Beck-Nielsen H. et al. Osteoprotegerin levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Calcified Tissue International* 2003; 73: 210-216
- Stilgren L.S., Rettmer E., Eriksen E.F. et al. Skeletal changes in osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand mRNA levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Bone* 2004, 35: 256-265
- Styrkasdóttir U., Halldorsson B.V., Gretasdóttir S. et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *The New England Journal of Medicine* 2008; 22: 2355-2365
- Suda M., Tanaka K., Sakuma Y. et al. Prostaglandin E(2) (PGE(2)) induces the c-fos and c-jun expressions via the EP(1) subtype of PGE receptor in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Calcified Tissue International* 2000; 66: 217-223.
- Szulc P. and Delmas P. D. Biochemical markers of bone turnover in men. *Calcified Tissue International* 2001; 69: 229-234
- Takács I., Lazáry A., Kósa J.P. et al. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. *European Journal of Endocrinology* 2010; 162: 423-431
- Takami H., Ikeda Y., Okinaga H. et al. Recent advances in the management of primary hyperparathyroidism. *Endocrine Journal* 2003, 50: 369-377

- Taniegra E. Hyperparathyroidism. *American Family Physician* 2004; 69, number 2
- Thorleifsson G., Holm H., Edvardsson V. et al. Sequence variants in the *CLDN14* gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nature genetics* 2009; 41: 926-930
- Udelsman R., Pasiaka J.L., Sturgeon C. et al. Surgery for asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009, 94: 366-372
- Ueland T., Bollerslev J., Wilson S.G. et al. No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone* 2007; 40: 175-181
- Uitterlinden A.G., Pols H.A. Genética de la osteoporosis. En: *Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Jarpyo editores 2004; 10: 49-54
- Veldhuis J.D., Roemmich J.N., Richmond A.D. et al. Endocrine control of body composition in infancy, childhood and puberty. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 114-146
- Vestergaard P., Mollerup C., Frøkjær V. et al. Cohort study of risk of fracture before and after surgery for primary hyperparathyroidism. *British Medical Journal* 2000; 321: 598–602

- Vieth R., Ladak Y. and Walfish P. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 185-191
- Vignali E., Viccica G., Diacinti D. et al. Morphometric vertebral fractures in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 2306-2312
- Vik A., Mathiesen E.B., Johnsen S.H. et al. Serum osteoprotegerin, sRANKL and carotid plaque formation and growth in a general population- the Tromso study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010; 8: 898-905
- Walker M.D., Fleischer J., Rundek T. et al. Carotid vascular abnormalities in primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 3849-3856
- Walker M.D., Donald J., McMahon W.B. et al. Neuropsychological features in primary hyperparathyroidism: a prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 1951-1958
- Walker M.D., Fleischer J.B., Di Tullio M.R. et al. Cardiac structure and diastolic function in mild primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010; 95: 2175-2179

- Wong B.R., Josien R., Lee S.Y. et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 28355-28359
- Wongdee K., Pandaranandaka J., Teerapompuntakit J. et al. Osteoblasts express claudins and tight junction-associated proteins. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 130: 79-90
- Wu B., Haigh P.I., Hwang R. et al. Underutilization of parathyroidectomy in elderly patients with primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010, 95: 4324-4330
- Wynne F., Drummond F., O'Sullivan K. et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcified Tissue International* 2002, 71: 26-35
- Yamada Y., Ando F., Niino N. et al. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003; 80: 344-349.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1998; 95: 3597-3602

- Yasuda H., Shima N., Nakagawa K. et al. A novel Molecular mechanism Modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 1999; 25: 109-113
- Younes N.A., Shafagoj Y., Khatib F. et al. Laboratory screening for hyperparathyroidism. *Clinica Chimica Acta* 2005; 353: 1-12
- Yu N., Donnan P.T., Murphy M.J. et al. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Tayside, Scotland, UK. *Clinical Endocrinology* 2009; 71: 485-493
- Yu N., Donnan P., Flynn R.W.V. et al. Increased mortality and morbidity in mild primary hyperparathyroid patients. The Parathyroid Epidemiology and Audit Research Study (PEARS). *Clinical endocrinology* 2010; 73: 30-34
- Zanchetta J.R., Bogado C.E. Raloxifene reverses bone loss in postmenopausal women with mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001; 16: 189-190
- Zhao H., Liu J., Ning G. et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene of bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporosis International* 2005; 16: 1519-1524



# viii. Publicaciones

derivadas de este

trabajo

1. Comunicación en forma de póster al 50º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición 2008. TÍTULO: “ *Análisis de la relación entre dos polimorfismos de un solo nucleótido de los genes RANK y RANKL y variables bioquímicas y densitométricas del hiperparatiroidismo primario*”. M. Piedra León, A. Berja Miguel, M.T. García-Unzueta, L. Vázquez Salví, C. Pesquera González, J. Freijanes Parada y J.A. Amado Señarís (Anexo 3).
2. Comunicación en forma de póster al XIV Congreso SEIOMM 2009. TÍTULO: “*Análisis de la relación entre el polimorfismo T393C del gen GNAS1 y variables bioquímicas y densitométricas en 322 pacientes con hiperparatiroidismo primario*”. Piedra León M., Berja Miguel A., García-Unzueta M.T., Amado Señarís J.A (Anexo 4).
3. Comunicación en forma de póster al International Symposium Parathyroids 2010. TÍTULO: “Analyzing the relationship between the T393C polymorphism of the GNAS1 gene and biochemical and densitometric parameters in 322 patients with primary hyperparathyroidism” Piedra León M., Berja Miguel A., Gutiérrez-Hierro M.T., García-Llama N., García-Unzueta M.T., Amado Señarís J.A (Anexo 5).
4. Comunicación en forma de póster al 13<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology 2011. TÍTULO: “*rs219780 SNP of CLDN14 gene is not associated with kidney*”

*stones, fractures or bone mineral density in primary hyperparathyroidism”*

Piedra M., Berja A., García-Unzueta M.T., Lavín B. A., Rentería C., Gutiérrez-Hierro M. T., García-Llama N., J. A. Amado (Anexo 6).

5. Comunicación en forma de póster al 13<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology 2011. *“Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density”*  
Piedra M., García-Unzueta M. T., Berja A., Riancho J.A., Valero C., Paule B., Lavín B., Amado J.A. (Anexo7).
  
6. Artículo en proceso de evaluación por la revista BMC clinical genetics. TÍTULO:  
*“Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density”*. M. Piedra, M. T. García-Unzueta, A. Berja, B. Paule, B. A. Lavín, C. Valero, J. A. Riancho, J. A. Amado (Anexo 8).

# x. Anexos

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**D.**

.....

.....

ha sido diagnosticado de .....

**Para completar el estudio de su enfermedad, el hospital está desarrollando un proyecto de investigación en el que se analizan algunos parámetros bioquímicos no habituales en sangre.**

**Con el fin de contribuir a este estudio doy mi consentimiento para que en las muestras de sangre que rutinariamente se extraen se puedan hacer dichas determinaciones y habiendo sido informado de que mi negativa a contribuir a dicho estudio no modificará para nada mi tratamiento.**

.....

.....

.....

**Nombre y Firma**

**D.N.I**

**Fecha**

Rev H<sup>a</sup> Clínica:

Lugar de nacimiento:

<b>NOMBRE</b>	<b>H° CLÍNICA</b>
<b>Edad</b>	<b>TA</b>
<b>Peso</b>	<b>Talla</b>
<b>H<sup>a</sup> Menstrual (menarquia, paridad, menopausia si/no, años de menopausia)</b>	
<b>Fracturas previas (lugar, espontáneas o traumáticas)</b>	
<b>Litiasis renal</b>	<b>Si / No</b>
<b>IR</b>	<b>Causa</b>
<b>Si / No</b>	<b>Duración</b>
<b>Ttos previos</b>  <i>Esteroides, hs tiroideas, litio, vit D, vit A, tiazidas, anticonvulsivantes – fenobarbital, fenitoina-, glucocorticoides</i>	
<b>Ttos actuales</b>  <i>Esteroides, hs tiroideas, litio, vit D, vit A, tiazidas, anticonvulsivantes, corticoides</i>	
<b>Procesos sistémicos previos</b>	
<b>Procesos sistémicos actuales</b>	