



**TESIS DOCTORAL**

**“DENSIDAD MINERAL ÓSEA Y MARCADORES DE  
REMODELADO ÓSEO EN PACIENTES CON FIBROSIS  
QUÍSTICA”**

**JOSEFA MORA VALLELLANO**

**SEVILLA, 2019**



**“DENSIDAD MINERAL ÓSEA Y MARCADORES DE  
REMODELADO ÓSEO EN PACIENTES CON FIBROSIS  
QUÍSTICA”**



**Facultad de Medicina**

**Hospital Universitario Virgen del Rocío**

**TESIS DOCTORAL**

**Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e  
Investigación Clínica**

**Línea: Investigación Biomédica**

**Memoria presentada por  
JOSEFA MORA VALLELLANO  
para optar al grado de doctor**

**DIRECTORES:**

**José Luis López-Campos Bodineau**

**Isabel Delgado Pecellín**

**Carmen Delgado Pecellín**



D. José Luis López-Campos Bodineau, facultativo en la Unidad Medico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y profesor asociado al CIS, Dña. Isabel Delgado Pecellín, responsable de la Unidad de Fibrosis Quística de Andalucía Occidental en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y Dña. Carmen Delgado Pecellín, responsable de la Unidad de Metabolopatías en Hospital Universitario Virgen del Rocío.

CERTIFICAN:

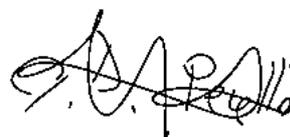
Que la presente Tesis Doctoral titulada “Densidad Mineral Ósea y Marcadores de Remodelado Óseo en pacientes con Fibrosis Quística”, presentada por Josefa Mora Vallellano, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla y Especialista en Análisis Clínicos, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada, autorizando su presentación para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.



José Luis López-  
Campos Bodineau



Isabel Delgado  
Pecellín



Carmen Delgado  
Pecellín

Sevilla, a 24 de Abril de 2019.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis López Campos Bodineau, facultativo de la Unidad Médico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias en el H.U. Virgen del Rocío, a la Dra. Isabel Delgado Pecellín, pediatra responsable de la Unidad de Fibrosis Quística y a la Dra. Carmen Delgado Pecellín, responsable de la Unidad de Metabolopatías del mismo hospital, por haberme guiado y acompañado en este recorrido.

A mi familia, por su apoyo incondicional y su esfuerzo para permitirme llegar hasta aquí.

A Diego, Marta y Laura, por creer siempre en mí y permanecer a mi lado hasta el final del camino.

A Ana Rodríguez, por tu generosidad y tu ayuda incondicional y siempre gratuita.

A Carmen Almeida, de la Unidad de Estadística y Metodología de la Investigación del H. U. Virgen del Rocío, por su asesoramiento en este trabajo.



*“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”*

Louis Pasteur



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 FIBROSIS QUÍSTICA .....	1
1.1.1 DEFINICIÓN.....	1
1.1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	1
1.1.3 FISIOPATOLOGÍA .....	2
1.1.3.1 Proteína CFTR: Estructura y regulación.....	2
1.1.3.2 Mutaciones de la proteína CFTR.....	4
1.1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	7
1.1.5 DIAGNÓSTICO .....	12
1.1.6 TRATAMIENTO.....	15
1.2 REMODELADO ÓSEO .....	17
1.2.1 FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.....	21
1.3 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO .....	41
1.3.1 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN LA EDAD PEDIÁTRICA... 48	
1.4 DENSITOMETRÍA ÓSEA .....	57
1.4.1 ESTUDIO CON DEXA. BASES FÍSICAS .....	57
1.4.2 PARÁMETROS, VALORES DE REFERENCIA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	62
1.4.3 OSTEOPOROSIS .....	64
1.4.4 RELACIÓN DENSIDAD ÓSEA Y FRACTURAS.....	68
1.5 DENSIDAD MINERAL ÓSEA Y CANTIDAD MINERAL ÓSEA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES .....	70
1.5.1 CRECIMIENTO Y MINERALIZACIÓN.....	70
1.5.2 VALORES DE NORMALIDAD DE DMO EN NIÑOS .....	71
1.5.3 FRACTURAS ÓSEAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA .....	74
<b>2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>79</b>
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	79
2.2 HIPÓTESIS.....	80
2.3 OBJETIVOS.....	80

<b>3. MÉTODO .....</b>	<b>85</b>
3.1 DISEÑO Y DESARROLLO DEL ESTUDIO .....	85
3.2 MÉTODOS DE MEDIDA .....	89
3.2.1 DENSITÓMETRO.....	89
3.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO ...	93
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	101
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>107</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>187</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Perspectiva histórica de la base fisiológica de la fibrosis quística. ....	2
Tabla 2. Manifestaciones clínicas concordantes con el diagnóstico de fibrosis quística.....	8
Tabla 3. Criterios de diagnóstico de la FQ (Consenso CFF) 1998.....	13
Tabla 4. Factores locales reguladores del remodelado óseo.....	30
Tabla 5. Muestra los principales marcadores de remodelado óseo. ....	42
Tabla 6. Características de “Hologic Explorer QDR series Bone Densitometer”. ..	60
Tabla 7. Definiciones de la OMS de Osteoporosis y Osteopenia.....	67
Tabla 8. Factores de riesgo de fractura.....	69
Tabla 9. Valores del Sistema Lunar de DMO (g/cm <sup>2</sup> ) en columna de niños sanos españoles de entre 6 y 16 años del área metropolitana de Barcelona distribuidas por sexo.....	91
Tabla 10. Valores del Sistema Lunar de DMO (g/cm <sup>2</sup> ) en columna en niños sanos españoles de entre 6 y 16 años del área metropolitana de Madrid distribuidas por sexo.....	91
Tabla 11. Cálculo del Z score respecto a las poblaciones de referencia. ....	92
Tabla 12. Estadística descriptiva de muestras FQ.....	108
Tabla 13. Distribución de muestras por sexo y edad en grupo FQ y control.....	109
Tabla 14. Z Scores de columna por sexo respecto a la población normal madrileña de Marco et al.....	111
Tabla 15. Z Scores de columna por sexo respecto a la población normal catalana de Del Río et al.....	112
Tabla 16 . Z Scores de columna respecto a poblaciones de referencia de Marco et al. y de Del Río et al. por edad sexo masculino. ....	113
Tabla 17. Z Scores de columna respecto a poblaciones de referencia de Marco et al. y de Del Río et al. por edad sexo femenino.....	114

Tabla 18. Comparación de la DMO Columna Total entre el grupo FQ y las poblaciones de normalidad madrileña y catalana en los dos grupos de edad en niños.....	116
Tabla 19. Comparación de la DMO Columna Total entre el grupo FQ y las poblaciones de normalidad madrileña y catalana en los dos grupos de edad en niñas.....	117
Tabla 20. Comparación de Z scores de columna entre grupos de edad en niños. ....	118
Tabla 21. Comparación de Z scores de columna entre grupos de edad en niñas. ....	118
Tabla 22. Análisis de correlación entre DMO Total Columna vs DMO L1, L2, L3, L4. ....	118
Tabla 23. Análisis de correlación entre Edad vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.....	121
Tabla 24. Análisis de correlación entre Talla vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3, DMO L4 según sexo. ....	122
Tabla 25. Análisis de correlación entre Peso vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.....	123
Tabla 26. Análisis de correlación entre IMC vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.....	124
Tabla 27. Análisis de la DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo en el grupo FQ. ....	125
Tabla 28. Análisis de la DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según el grado de insuficiencia pancreática (IP/SP) en el grupo FQ. ....	125
Tabla 29. Resultado del análisis de regresión lineal múltiple.....	125
Tabla 30. Análisis de los marcadores de remodelado óseo según grupos (FQ vs Control).....	128
Tabla 31. Análisis del marcador IL-6 según grupos (FQ vs Control).....	128

Tabla 32. Análisis de los marcadores de remodelado óseo según el grado de insuficiencia pancreática (IP/SP) en el grupo FQ.....	129
Tabla 33. Análisis de correlación entre los marcadores de remodelado óseo vs Z Score columna madrileña y Z Score columna catalana. ....	130
Tabla 34. Análisis de correlación entre el marcador IL-6 vs Z Score columna madrileña y Z Score columna catalana. ....	130
Tabla 35. Análisis de correlación entre los marcadores en el grupo FQ.....	131
Tabla 36. Análisis de correlación entre los marcadores vs IL-6 en el grupo FQ..	131
Tabla 37. Análisis de correlación entre los marcadores en el grupo control. ....	132
Tabla 38. Análisis de correlación entre los marcadores vs IL-6 en el grupo control. ....	132
Tabla 39. Análisis de regresión logística multivariante.....	133



## Índice de figuras

Figura 1. Localización del gen CFTR. ....	3
Figura 2. Tránsito de la proteína CFTR desde el retículo endoplasmático hasta la membrana celular.....	4
Figura 3. Categorías de las mutaciones en el gen CFTR. ....	7
Figura 4. Mecanismo subyacente a los niveles elevados de cloruro de sodio en el sudor de pacientes con Fibrosis Quística.....	9
Figura 5. Algoritmo diagnóstico.....	14
Figura 6. Fases del proceso de remodelado óseo. ....	19
Figura 7 Vías de señalización de RANK. ....	39
Figura 8. Representación esquemática de la molécula de colágeno tipo 1 y formación de P1NP y P1CP.....	43
Figura 9 . Metabolismo de la osteocalcina. ....	46
Figura 10. Niveles de FAO en niños normales (círculos rellenos) y femeninos (círculos vacíos) en función de la edad.....	51
Figura 11. Niveles de OC en niños y niñas normales en función de la edad.....	52
Figura 12. Niveles medios ( $\pm$ SD) de los marcadores de P1NP en las cinco etapas puberales en niños y niñas.....	54
Figura 13. Correlación entre las concentraciones séricas de OPG y la edad en sujetos normales. ....	55
Figura 14. Diagrama de puntos con curvas de referencia para las concentraciones de CTX-1 en función de la edad y el sexo.....	56
Figura 15. Posición del paciente: columna lumbar.....	59
Figura 16. Características de los pacientes seleccionados.....	107
Figura 17 . Distribución de los valores del Z Score en DE en columna por sexo, respecto a la población normal madrileña de Marco et al. ....	111
Figura 18. Distribución de los valores del Z Score en DE en columna por sexo, respecto a la población normal catalana de Del Rio et al. ....	112

Figura 19 . Representación de Z Scores de columna respecto a las dos poblaciones de referencia (madrileña y catalana) en función de la edad y sexo masculino. ....	113
Figura 20 . Representación de Z Scores de columna respecto a las dos poblaciones de referencia (madrileña y catalana) en función de la edad y sexo femenino. ....	114
Figura 21 . Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L1.....	119
Figura 22. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L2.....	119
Figura 23. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L3.....	120
Figura 24. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L4.....	120
Figura 25. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Total Columna vs edad. .....	121
Figura 26. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Columna Total vs talla.	122
Figura 27. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Columna Total vs peso. .....	123
Figura 28. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Total Columna vs IMC. .....	124

## **Abreviaturas**

ATP: Adenosine triphosphate (Adenosina trifosfato)

BMC: Bone mineral content (Contenido mineral óseo)

BMD: Bone mineral density (Densidad mineral ósea)

BMP: Bone morphogenic protein (Proteína ósea morfogenética)

CBFA1: Core-binding factor alpha 1 (Factor de unión al núcleo alfa 1) o también conocido como RUNX2: runt-related transcripcion factor 2 (Factor de transcripción 2 relacionado con runt)

CFF: Cystic Fibrosis Foundation (Fundación de fibrosis quística)

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane regulator (Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)

CTX: C-terminal telopeptides type I collagen (Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1)

DAP12: DNAX-activating protein of 12 kDa (Proteína activadora de DNAX 12)

DE: Desviación estándar

DEXA o DXA: Densitometría

DMO: Densidad mineral ósea

FAO: Fosfatasa alcalina ósea

FAT: Fosfatasa alcalina total

FcR $\gamma$ : Receptores gamma para el Fc

FGF: Fibroblastic growth factor (Factor de crecimiento fibroblástico)

FQ: Fibrosis quística

GH: Growth hormone (Hormona del crecimiento)

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)

IGF: Insulin growth factor (Factor de crecimiento similar a insulina)

IL: Interleuquina

IP: Insuficiencia pancreática

ISCD: International society for clinical densitometry (Sociedad internacional de densitometría clínica)

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (Motivos de activación en inmunorreceptores basados en tirosina)

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (Motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina)

JNK: Jun N-terminal kinase (Kinasa N-terminal Jun)

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de monocito-macrófago)

MMP: Matrix metalloproteinase (Metaloproteinasa de la matriz)

MO: masa ósea

NBD: Nucleotide binding domain (Dominio de unión a nucleótidos)

NFATC1: Nuclear factor of activated t cells, cytoplasmic 1 (Factor nuclear de las células T activadas, citoplasmático 1)

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor  $\kappa$ B (Factor nuclear Kappa Beta)

LT: Leucotrienos

OC: Osteocalcina

OMS: Organización mundial de la salud

OPG: Osteoprotegerina

ORCC: Outwardly rectifying chloride channel (Canal de cloruro de rectificación exterior)

PG: Prostaglandina

P1NP: N-terminal propeptide of type I collagen (Propérido aminoterminal del procolágeno tipo 1)

PDGF: Platelet-derived growth factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PTH: Parathormona

QCT: Quantitative computerized tridimensional tomography (Tomografía axial cuantitativa)

QDR: Quantitative digital radiology (Radiología digital cuantitativa)

QUS: Quantitative ultrasound (Ultrasonidos cuantitativo)

RANK: Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (Receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B)

RANKL: Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B)

RE: Retículo endoplasmático

SRC: Stored response chain (Proteína derivada del protooncogen src, que activa a tirosin quinasa)

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ )

TRAF: Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor (Factor asociado con el receptor de TNF).

TNF: Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

VEGF: Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

WNT: Wingless e Int





# INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 FIBROSIS QUÍSTICA

### 1.1.1 DEFINICIÓN

La fibrosis quística (FQ) continúa siendo la enfermedad genética más frecuente y letal de la raza blanca. Tiene una incidencia de 1 por cada 2.500-6.000 recién nacidos, dependiendo de la región y de la etnia de origen, y un porcentaje de portadores sanos también variable entre 1:20-37 (1).

La enfermedad se produce por mutaciones en el gen que codifica la denominada proteína reguladora de la conductibilidad transmembrana de la FQ (CFTR, por sus siglas en inglés: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) que actúa como canal de cloro y participa en la liberación de adenosina trifosfato (ATP) y en la regulación de otros canales de transporte de iones. Esta proteína se encuentra en todos los tejidos exocrinos, en el borde apical de las células epiteliales (2-4).

El transporte alterado de este canal de cloruro y/u otros iones afectadas, como el sodio y bicarbonato, conduce a secreciones espesas, viscosas en los pulmones, el páncreas, el hígado, el intestino y el tracto reproductivo, y al aumento del contenido de sal en las secreciones de las glándulas sudoríparas (3,5,6). Es una enfermedad multisistémica que condicionan la variedad de sus manifestaciones clínicas.

### 1.1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los primeros informes de niños con cuadro clínico sugestivo de FQ datan de mediados del siglo XVII, muchos de ellos son, inclusive, anteriores a la canción infantil alemana fechada en el siglo XV que dice: "El niño a quien al besarle la frente sabe salado, pronto morirá".

Evidencias de un sudor salado en estos individuos, se encuentran en los textos folklóricos que fechan del medievo. No obstante han tenido que pasar muchos años

(hasta principios de los 80) para entender la relación existente entre la anomalía en la sudoración y las graves alteraciones descritas por Fanconi por primera vez en 1936 (7). En la Tabla 1 se muestra un breve resumen de la historia de la enfermedad (8–14).

**Tabla 1. Perspectiva histórica de la base fisiológica de la fibrosis quística.**

**Antigüedad-Edad media:** Textos folklóricos describiendo costumbres supersticiosas, encantamientos, males de ojos, etc, sobre aquellos niños que tenían sudor salado al besarlos.

**1595: Peter Pauw**, profesor de anatomía, realiza la primera biopsia documentada a una niña de 11 años, describiendo alteraciones pancreáticas y huyendo de las creencias exotéricas.

**1936: Guido Fanconi**, hace la primera descripción sintomática detallada de la enfermedad relacionando anomalías digestivas y respiratorias.

**1938: Dorothy Andersen**, asoció el íleo meconial con la FQ. Usa por primera vez el término de FQ del páncreas.

**1943: Farber** reconoce a la FQ como una enfermedad sistémica, y acuña el término “mucoviscidosis”.

**1945: Andersen & Hodges** concluyen que la FQ se hereda en forma autosómica recesiva.

**1953: Paul Di Sant’Agnese** redescubre casuísticamente y asocia el concepto de sudor salado a la mucoviscidosis, describiendo el primer test diagnóstico para la enfermedad usado hasta nuestros días.

**1959: Gibson & Cooke** describieron el método de iontoforesis con pilocarpina para estimulación y recolección del sudor, que sigue siendo el estándar hasta la fecha.

**1950s y 1960s:** Aunque la causa fundamental de lesión se desconocía, se fueron perfilando las diferentes formas clínicas.

**1979:** Se pudo disponer de un método de Screening Neonatal mediante la utilización de tripsina inmunorreactiva (TIR).

**1983: Paul Quinton, Michael Knowles y Richard Boucher** describen un transporte de sal alterado en los epitelios de los órganos afectados como causante de las alteraciones fisiológicas.

**1989: El grupo Lap-Chee Tsui**, identifica y clona el gen de la FQ, ubicado en el brazo largo del cromosoma 7, que codifica para la proteína CFTR.

**1991:** Descubrimiento de que la proteína CFTR es un canal de cloro.

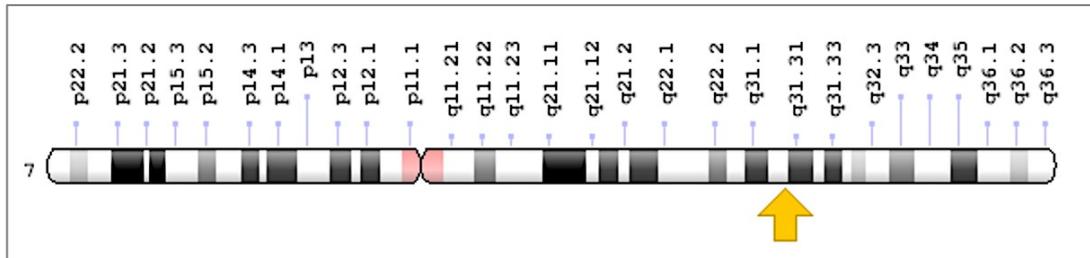
**1991 – Actualidad:** a) Se identifican más de 1900 mutaciones agrupadas en 7 clases, siendo la Phe508del, la primera descrita y más frecuente a nivel mundial. b) Importantes avances en el conocimiento de las bases genéticas y fisiopatológicas de la FQ. c) Diagnóstico cada vez más precoz debido a la expansión de los programas de cribado neonatal. d) Puesta en funcionamiento de Unidades monográficas de referencia de FQ, donde los pacientes se tratan de forma multidisciplinaria.

### 1.1.3 FISIOPATOLOGÍA

#### 1.1.3.1 Proteína CFTR: Estructura y regulación

La FQ es causada por la mutación de un gen de 230 Kb constituido por 180.000 pares de bases distribuidos en 27 exones, localizado en el brazo largo del

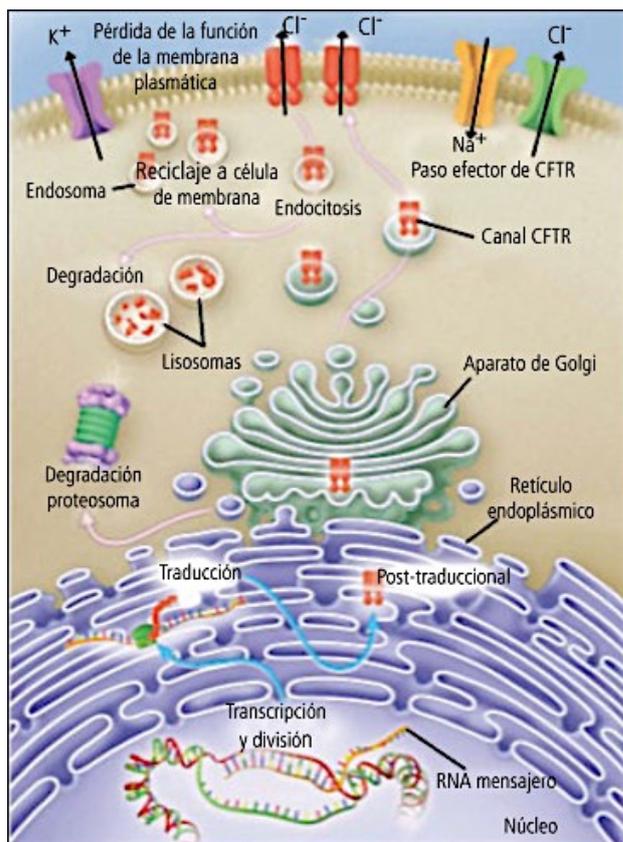
cromosoma siete (7q31.2) (Figura 1), que codifica para una proteína de 1480 aminoácidos llamada Regulador de la Conductancia Transmembrana de la FQ (2).



**Figura 1. Localización del gen CFTR.**

*Reproducido con permiso desde NIH U.S. National Library of Medicine.*

La proteína CFTR es sintetizada en la membrana del retículo endoplásmico (RE), luego pasa al aparato de Golgi donde es glicosilada y sufre un plegamiento sobre sí misma para posteriormente pasar a través del citoplasma, acompañada por proteínas chaperonas, y finalmente localizarse en la membrana apical de los epitelios secretores de las glándulas exocrinas (15). Aquí funcionarán como canales que intervienen directamente en el intercambio hidroelectrolítico intra-extracelular, jugando un papel fundamental en la excreción adecuada de fluidos en las glándulas exocrinas de nuestro cuerpo: páncreas, glándulas sudoríparas, hígado, del aparato respiratorio, del intestino y del aparato reproductor (Figura 2) (16).



**Figura 2. Tránsito de la proteína CFTR desde el retículo endoplasmático hasta la membrana celular.**

*Reproducido con permiso desde Fielbaum O. Avances en Fibrosis Quística. Rev Med Clin Condes-2011;22(2)150-159.*

### 1.1.3.2 Mutaciones de la proteína CFTR

Hasta el momento se han identificado más de 1900 mutaciones del gen CFTR asociadas a la enfermedad. Las mutaciones del gen CFTR se encuentran disponibles para consulta en la Cystic Fibrosis Mutation Database (17). La primera mutación descrita, y la más frecuente a nivel mundial, es la Phe508del, pero existen otras mutaciones específicas cuya frecuencia varía entre los distintos grupos étnicos. En España se ha descrito una frecuencia media de la Phe508del de entre 50-60% del total de cromosomas estudiados, siendo la segunda en frecuencia la Gly542X con un 4-8%, seguida por la Asn1303Lys con un 2-4% (18). Las mutaciones descritas en la actualidad se clasifican en 7 tipos o clases en función del mecanismo por el que causan la enfermedad (19) (Figura 3).

***Clase I: Defecto en la síntesis de la proteína CFTR***

Las mutaciones de esta clase dan lugar a una ausencia de síntesis de proteína CFTR, debido a que afectan a zonas de empalme alterando el procesamiento del ARN, a causa de mutaciones de parada que resultan en proteínas CFTR truncadas que son en su mayoría inestables, y por mutaciones que cambian la pauta de lectura (delecciones e inserciones). Cerca del 5 al 10% de las mutaciones del gen CFTR son debidas a este defecto de transcripción y se denominan con una X como la G542X (20,21).

***Clase II: Defecto en el procesamiento***

Después de ser traducido en un péptido en los ribosomas, la proteína CFTR experimenta una serie de procesos de glicosilación y plegamiento, en el RE y el aparato de Golgi. Las mutaciones de la clase II causan la debilitación de este proceso debido a que se produce la síntesis de una proteína CFTR que no puede plegarse correctamente en el RE, con lo que se pierde resistencia a la acción de las proteasas, y es destruida rápidamente por acción de las proteasas 26S presentes en el citoplasma antes de su glicosilación hasta una forma madura en el aparato de Golgi (22). A este grupo pertenece la mutación más común en la FQ, la Phe508del.

***Clase III: Defecto en el procesamiento***

Estas mutaciones afectan el proceso de regulación al impedir la unión del ATP y la hidrólisis de los dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2, nucleotide binding domain, por sus siglas en inglés), requeridos para la activación del canal. Las alteraciones en el dominio NBD1 pueden afectar también la regulación de otros canales como el ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) o el canal de potasio ROMK2+. El efecto neto de la CFTR es una cantidad normal no funcional en la membrana apical de las células (23). La mutación sin sentido G551D es un ejemplo de mutaciones de la clase III.

#### ***Clase IV: Defecto en la conductancia***

La mayoría de las mutaciones diagnosticadas hasta la fecha se localizan en la región del dominio transmembrana MSD1 (por sus siglas en inglés: membrane spanning domain), el cual está implicado en la formación del poro del canal. En esta clase de mutación la proteína CFTR también puede ser producida, procesada, e insertada en la membrana apical, sin embargo, la conductancia a través del canal esta alterada, pero la proteína mantiene cierta función residual (23).

Entre las mutaciones más frecuentes de la clase IV se encuentran la R117H, R347P y la R334W. El efecto neto es la presencia de una cantidad normal del CFTR en la membrana apical pero presentan una reducción en el transporte de cloro en este canal (24).

#### ***Clase V: Defecto parcial en la producción o en el procesamiento***

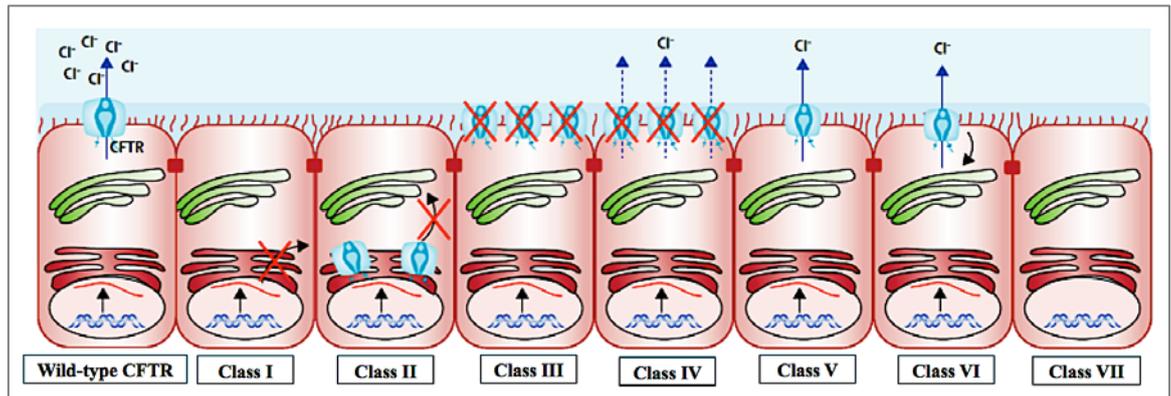
En esta clase de mutación se presenta una reducida síntesis de CFTR. Por ello se origina una disminución de la cantidad de proteína CFTR activa presente en la membrana apical; y pueden asociarse a mutaciones del promotor o a un tráfico ineficaz (23). Por esta razón, solamente se afectan los órganos altamente sensibles a la disfunción del CFTR. Algunas mutaciones encontradas con una frecuencia relativa alta como la 2789+5G→A o la 3849+10kbC→T, pertenecen a esta clase. El efecto neto es una cantidad funcional reducida de la CFTR en la membrana apical (24).

#### ***Clase VI: Defecto en la regulación de otros canales.***

En esta clase se agrupan mutaciones que afectan las propiedades reguladoras del CFTR sobre otros canales de iones como el ORCC o el ENAC (Amiloride Sensitive Sodium Channel) (24).

**Clase VII: Defecto en la síntesis de ARNm.**

Las mutaciones de la clase VII son también llamadas mutaciones no rescatables ya que no tienen rescate farmacológico per sé. Se trata de grandes deleciones como la mutación dele,2,3 (21 Kb), 1717-1G→A. El defecto a nivel del CFTR implica la no formación del ARNm. (25,26).



**Figura 3. Categorías de las mutaciones en el gen CFTR.**

*Adaptado de De Boeck, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. Lancet Respir Med 2016 Aug;4(8):662-674.*

**1.1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Las manifestaciones clínicas de la FQ pueden ser muy variadas, en función del órgano implicado. Se muestra un resumen en la tabla 2 (27).

**Alteraciones de las glándulas sudoríparas**

Debido a la afectación de las glándulas sudoríparas, los pacientes con FQ se caracterizan por un sudor salado con una concentración de sales de 3 a 5 veces superior a un individuo normal, que aunque irrelevante patológicamente, sigue utilizándose como principal herramienta diagnóstica con el Test Gibson y Cooke (7). La función de CFTR es la reabsorción de ión cloruro secretado por las glándulas sudoríparas. Cuando el CFTR está ausente o funciona de manera inadecuada, el proceso de reabsorción de cloro y sodio desde el lumen del conducto hacia el interior

de las células es ineficiente dando como resultado un nivel de ión cloruro en sudor anormalmente elevado.

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas concordantes con el diagnóstico de fibrosis quística.**

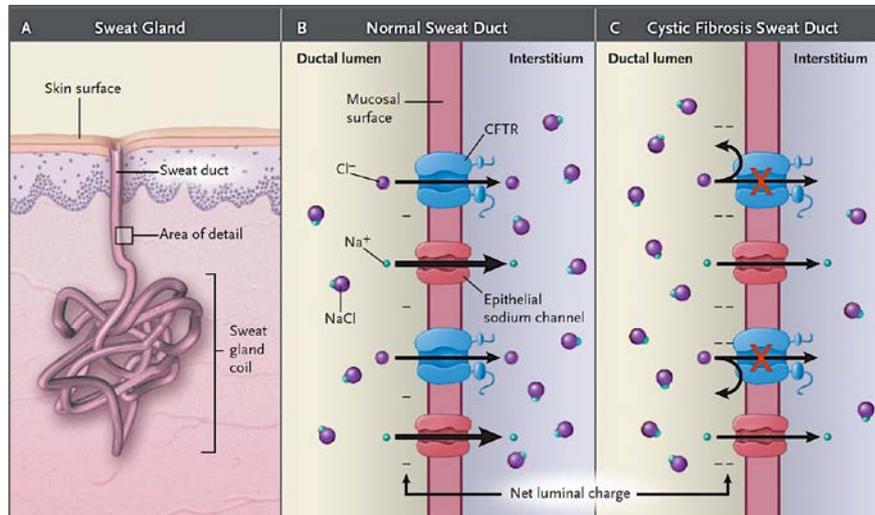
<ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>ENFERMEDAD SINO-PULMONAR CRÓNICA</b> que se caracteriza por:<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonización/infección persistente con bacterias típicas en la FQ como <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> no capsulado, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoide o no mucoide y <i>Burholderia cepacea</i>.</li><li>- Tos y expectoración crónica.</li><li>- Anomalías persistentes en la radiografía de tórax, por ejemplo: bronquiectasias, atelectasias, infiltrados, hiperinsuflación.</li><li>- Obstrucción de las vías respiratorias con sibilancias y atrapamiento aéreo.</li><li>- Pólipos nasales; anomalías de los senos paranasales en la radiografía simple o en el TAC</li><li>- Acropaquias.</li></ul></li><li>2. <b>ANOMALÍAS GASTROINTESTINALES Y NUTRICIONALES:</b><ul style="list-style-type: none"><li>- Intestinales: Íleo meconial; síndrome de obstrucción intestinal distal (SOID); prolapso rectal.</li><li>- Pancreáticas: Insuficiencia pancreática (IP) exocrina; pancreatitis recurrente.</li><li>- Hepáticas: Enfermedad hepática crónica con manifestaciones clínico-analíticas o evidencia histológica de cirrosis biliar focal o cirrosis multilobular.</li><li>- Nutricionales: Retraso estatura-ponderal (malnutrición calórico-proteica); hipoproteinemia y edema; complicaciones secundarias al déficit de vitaminas liposolubles.</li></ul></li><li>3. <b>SÍNDROMES PIERDE-SAL:</b> Depleción aguda de sal; alcalosis metabólica crónica.</li><li>4. <b>ANOMALÍAS UROGENITALES MASCULINAS</b> que resultan en una azoospermia obstructiva</li></ol>
--

*Adaptado de Dapaena F.J. et al. Actualización terapéutica en la fibrosis quística. Vol. 27. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud; 2003. 129-144 p.*

Las glándulas sudoríparas de sujetos normales producen de manera inicial una secreción hipertónica, la cual es modificada en sus concentraciones de cloro y sodio a su paso a través del conducto de la glándula antes de emerger a la superficie de la piel. Los iones de sodio son ávidamente absorbidos a través de los canales apicales de sodio seguido de una absorción de ión cloruro a través del CFTR y de la absorción de cloruro de sodio y agua de manera pasiva. En pacientes con FQ, la

## Introducción

ausencia de función del CFTR limita la reabsorción de ión cloruro. Esto ocasiona una diferencia de potencial eléctrico el cual limita la reabsorción de sodio dando como resultado una secreción con contenido de sal elevado (2) (Figura 4) .



**Figura 4. Mecanismo subyacente a los niveles elevados de cloruro de sodio en el sudor de pacientes con Fibrosis Quística.**

Los conductos de sudor (Panel A) en pacientes con fibrosis quística difieren de aquellos en personas sin la enfermedad en la capacidad de reabsorber cloruro antes de la aparición de sudor en la superficie de la piel. Una vía principal para la absorción de Cl es a través de CFTR, situada dentro de las membranas plasmáticas luminales de las células que recubren el conducto (es decir, en la superficie apical o mucosal de la célula) (Panel B). La disminución de la reabsorción de cloruro en el marco de la continua absorción de sodio conduce a una elevada diferencia de potencial transepitelial a través de la pared del conducto de sudor, y el lumen se vuelve más cargado negativamente debido a la falta de reabsorción de cloruro (Panel C). El resultado es que el flujo total de cloruro sódico disminuye notablemente, dando lugar a un aumento del contenido de sal. El espesor de las flechas corresponde al grado de movimiento de los iones.

Reproducido con permiso desde Rowe S.M. et al. Mechanisms of Disease Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352:1992-2001. Copyright Massachusetts Medical Society.

## Alteraciones del Tracto Digestivo

### Páncreas

CFTR se expresa en células epiteliales ductales. La falta de función de CFTR resulta en la reducción del contenido de agua de las secreciones pancreáticas y disminución del pH (bajo contenido de  $\text{HCO}_3^-$ ). Esto provoca que los proenzimas pancreáticos queden retenidos en los conductos pancreáticos a concentraciones

anormalmente elevadas y se activen prematuramente llevando a la destrucción de tejido y fibrosis (7). La importancia de la función secretora de  $\text{HCO}_3^-$  de la CFTR en la fisiología pancreática queda demostrada con la identificación de mutantes de la proteína CFTR que, presentando alterado el transporte de  $\text{Cl}^-$  pero no el de  $\text{HCO}_3^-$ , no desarrollan IP (28,29).

Las secuelas de la IP exocrina incluyen absorción insuficiente crónica, retraso del crecimiento, hipovitaminosis liposoluble, altos niveles de tripsinógeno inmunorreactivo en suero (una prueba diagnóstica utilizada en la detección sistemática neonatal) y la pérdida de masa celular de los islotes de Langerhans. La diabetes mellitus relacionada con la FQ se manifiesta en más de 30% de los adultos con la enfermedad y es probablemente multifactorial en su naturaleza (atribuible a la destrucción progresiva del páncreas endocrino, resistencia a la insulina por cortisol y otros factores).

La IP exocrina está presente en 80-85% de los pacientes con FQ. Más del 50% de los pacientes presentan signos clínicos de IP durante los primeros años de vida y hasta el 90% lo manifiestan durante el primer año.

La medida de las enzimas pancreáticas fecales se utiliza para diagnosticar la insuficiencia pancreática exocrina, usualmente midiendo elastasa-1 fecal (30). La derivación ductal en pacientes con función pancreática parcialmente conservada puede causar episodios recurrentes de pancreatitis y, a largo plazo, la pérdida total de secreción enzimática.

### ***Alteración ósea***

La enfermedad ósea relacionada con la FQ ha estado emergiendo en paralelo con el aumento progresivo de la supervivencia. Entre el 10 y el 15% de los pacientes, aumentando hasta el 50% en la fase tardía de la enfermedad, muestran baja densidad mineral ósea por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) y

corren riesgo de osteopenia, osteoporosis y fracturas vertebrales (31). El riesgo de enfermedad ósea está relacionado con la desnutrición, el bajo índice de masa corporal (IMC), la gravedad de la enfermedad pulmonar y una variedad de otros factores, como la movilidad deficiente, la reducción de la absorción de vitamina D, bajos niveles de vitamina K, el uso de esteroides, citoquinas inflamatorias circulantes, y aumento de la rotación ósea. CFTR se expresa en las células óseas, y un papel directo de la proteína en el metabolismo óseo no puede excluirse (32,33).

En los últimos años, se ha prestado mayor atención a las consecuencias a corto y largo plazo de las enfermedades crónicas infantiles en la salud ósea. Se sabe que los trastornos pediátricos, junto con sus comorbilidades y modalidades de tratamiento asociadas, tienen un efecto multifactorial sobre el desarrollo óseo. La fuerza ósea, el producto de la calidad ósea y la mineralización, está determinada en gran parte por la masa ósea máxima alcanzada durante la infancia y la adolescencia (34). Hay una multitud de hormonas y otros factores intrínsecos involucrados en el modelado y remodelado óseo, y un crecimiento adecuado depende de la vitamina óptima D niveles, estado nutricional y ejercicio. La nutrición y la actividad física inadecuadas junto con la inflamación y enfermedad crónica pueden comprometer la masa ósea máxima y acelerar la pérdida ósea y, en última instancia, aumentar el riesgo de osteoporosis y fractura (35). En el pasado, la baja densidad mineral ósea (DMO) era una afección vista en adultos. Con el aumento de la prevalencia y la detección de la disminución de la mineralización ósea en niños y adolescentes, se cree que la enfermedad ósea del adulto puede originarse en estos años anteriores. Además, hay una falta de datos prospectivos que evalúen la relación entre la densidad ósea y la incidencia de fracturas en niños con enfermedades crónicas (35) que pueden persistir hasta la edad adulta, causando un deterioro significativo en la calidad de vida.

### 1.1.5 DIAGNÓSTICO

El cribado neonatal ha cambiado radicalmente la sistemática diagnóstica y terapéutica de la FQ. Actualmente, en los países o comunidades donde se realiza, la norma de actuación va dirigida al diagnóstico precoz de enfermedad, que puede llevarse a cabo mediante un seguimiento clínico estricto, estudios de imagen y funcionales seriados, evaluación de marcadores serológicos e inflamatorios y detección rápida de la adquisición de microorganismos con el fin de permitir la instauración racional de una terapia precoz y agresiva (36).

En el momento actual, el diagnóstico de la enfermedad continúa basándose en la característica anómala que tiene los enfermos con FQ de eliminar una cantidad 4 a 5 veces más elevada de electrolitos por el sudor que la mayoría de los individuos sanos.

La determinación de los electrolitos en el sudor, principalmente de cloro, se denomina *prueba del sudor*. Una concentración de cloro superior a 60 mmol/L confiere a la prueba del sudor la condición de positiva. Sin embargo, se está utilizando con fines prácticos el cálculo de la conductividad de cloro con aparatos de fácil manejo para cribar posibles casos de FQ entre un gran número de enfermos sospechosos de padecer la enfermedad. Una cifra de conductividad superior a 90 ó 95 mmol/L (según distintas referencias) indica la posibilidad de que se está ante un enfermo con FQ.

En el diagnóstico de un enfermo de FQ se necesita que el paciente presente una clínica compatible y acordes a los criterios diagnósticos de la FQ (Consenso Cystic Fibrosis Foundation: CFF) (Tabla 3).

**Tabla 3. Criterios de diagnóstico de la FQ (Consenso CFF) 1998.**

<p>Uno o más rasgos fenotípicos característicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Historia de FQ en un hermano o primo hermano.</li> <li>○ Cribado neonatal positivo.</li> </ul>
<p>Y evidencia de disfunción del CFTR mediante uno o más de la siguiente</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Concentración de cloro en sudor elevada en 2 ocasiones (<math>\geq 60</math> mmol/L) por iontoforesis con pilocarpina.</li> <li>○ Presencia de 2 mutaciones causantes de la enfermedad.</li> <li>○ Diferencia de potencial (PD) nasal anormal (transporte iónico anómalo a través del epitelio nasal).</li> </ul>

Algunas conclusiones del consenso fueron objeto de controversia. En 2001, un grupo de expertos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la European Cystic Fibrosis Society (37) proponen una nueva clasificación para la “fibrosis quística y trastornos relacionados” para que fueran codificadas en la undécima edición de la Internacional Classification of Diseases (ICD-11), publicada por la OMS. Basándose la clasificación principalmente en la clínica y no el laboratorio, recogiendo las incertidumbres del conocimiento actual sobre el CFTR y su disfunción cuando la afectación clínica se reduce a un solo órgano, por ejemplo ausencia bilateral de conductos deferentes, pancreatitis, etc.

Los cambios conceptuales respecto a las conclusiones del consenso de la CFF fueron desarrolladas en el consenso europeo de 2006 (38), que coloca de nuevo la clínica y el test del sudor en el centro del diagnóstico de la FQ, y propone algoritmos sobre metodología a seguir. A medida que nuestra comprensión de la fisiopatología de la FQ ha evolucionado, tres factores han contribuido a la necesidad de perfeccionar los criterios diagnósticos formales. En primer lugar, el cribado neonatal que ha alterado el escenario de diagnóstico inicial para la mayoría de los pacientes nuevos. Establecer un diagnóstico de FQ para estos recién nacidos, a menudo asintomáticos, requiere la confirmación de un cribado positivo. En segundo lugar, el

mayor uso de las pruebas genéticas CFTR y el progreso significativo de la comprensión de las variantes de CFTR han permitido que las pruebas genéticas CFTR desempeñen un papel más importante en la definición de la enfermedad relacionada con la disfunción de CFTR. Finalmente, ha habido un creciente reconocimiento de las situaciones en las que los criterios de diagnóstico de FQ anteriores no dieron una respuesta adecuada a si una persona tiene FQ. El ejemplo más común ocurre cuando un recién nacido tiene un cribado positivo pero no cumple con los criterios del test de sudor o genéticos para confirmar el diagnóstico. Este es el propósito abordado en el consenso europeo sobre el diagnóstico de FQ en 2017, donde se publican las pautas a seguir (39). En nuestro hospital se aplica el siguiente algoritmo diagnóstico (40), (Figura 5).

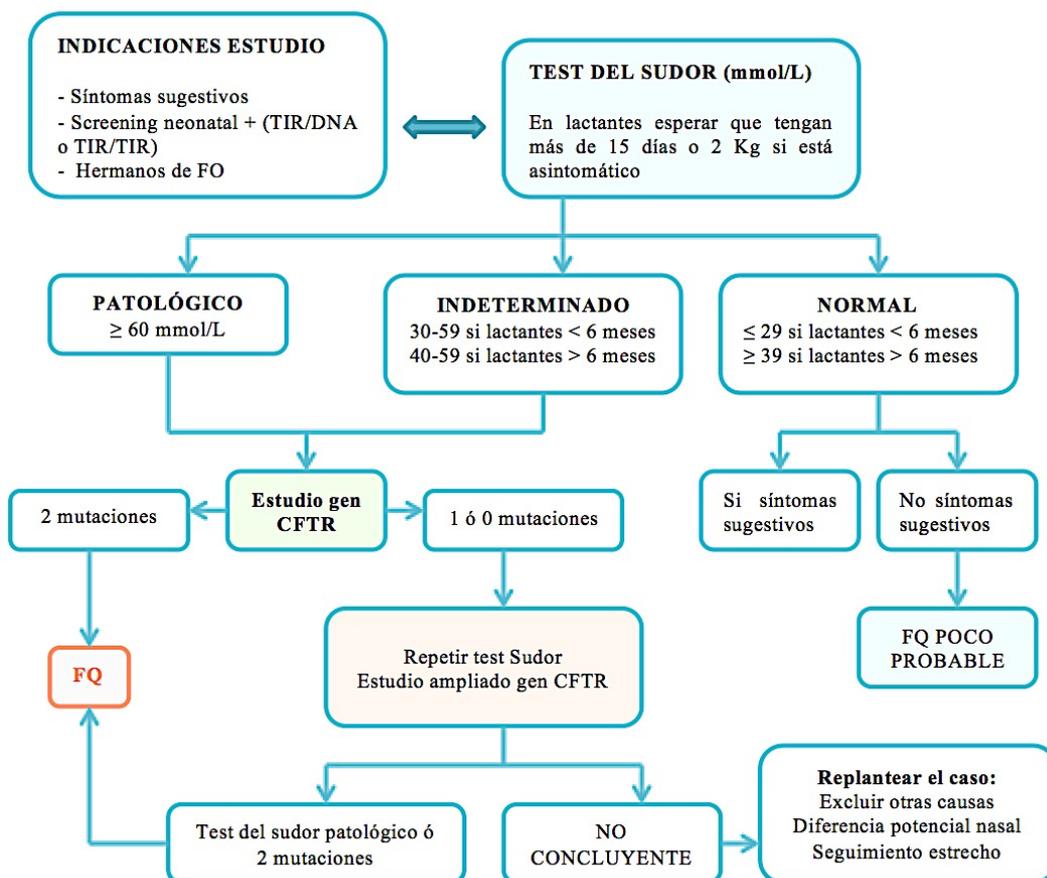


Figura 5. Algoritmo diagnóstico.

La afectación de la glándula sudorípara da lugar a una elevada concentración de electrolitos en sudor, que se utilizan desde hace más de 50 años como prueba diagnóstica para FQ. Los intervalos de referencia aceptados universalmente para la concentración de cloro en sudor son:  $\geq 60$  mmol/L para considerar un diagnóstico de FQ positivo, 40-60 mmol/L se considera límite, y  $< 40$  mmol/L normal. Los valores límites y de normalidad cambian para lactantes de  $< 6$  meses siendo 39-60 mmol/L y  $\leq 29$  mmol/L respectivamente.

### 1.1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento de la FQ es multidisciplinario y debe proporcionarse en centros especializados que tengan acceso a todas las subespecialidades implicadas en la FQ. Este enfoque multiprofesional ha sido bastante exitoso y ha contribuido en gran medida a aumentar la esperanza de vida, mejorar la función pulmonar y en la prevalencia de infecciones crónicas (41).

En líneas generales, el tratamiento rutinario de la FQ comprende la enfermedad respiratoria, la insuficiencia pancreática y la desnutrición.

El tratamiento de la enfermedad pulmonar tiene como fin el control de la triada característica: infección, inflamación y obstrucción de las vías respiratorias, mediante fisioterapia respiratoria y antibioterapia sistémica y/o nebulizadas, en función de las colonizaciones del aparato respiratorio.

Los pacientes con FQ presentan un gasto energético en reposo aumentado (42–44). Responsables de este aumento son la enfermedad pulmonar, las sobreinfecciones, la inflamación crónica y el aumento del trabajo respiratorio.

Además, existe un aumento de pérdidas digestivas (malabsorción por insuficiencia pancreática, enfermedad hepática o de la mucosa intestinal), pulmonares (pérdida de proteínas en esputo), en sudor (sales y ciertas vitaminas) y orina (glucosuria en los pacientes diabéticos). Todo ello condiciona que, de forma general, estos

pacientes tengan unos requerimientos energéticos totales mayores que los de la población general.

Siempre que exista insuficiencia pancreática se deben administrar enzimas pancreáticas en la cantidad adecuada para evitar la malabsorción de grasa y la esteatorrea. Se debe aportar un 35-50% del valor calórico total en forma de grasas. Y en este caso, también deben recibir suplementos de vitaminas liposolubles A, D y E, siendo más controvertido el uso universal del suplemento con vitamina K (42,43,45-47).

En los últimos años, algunos pacientes con FQ, en función de sus mutaciones, se están beneficiando de una medicina personalizada gracias al desarrollo de los denominados fármacos moduladores de CFTR que incluye a correctores y moduladores del canal. Dentro del desarrollo de los fármacos reparadores de la proteína CFTR, se han identificado 3 grupos principales (48). En primer lugar, los fármacos supresores del codón de parada prematuro que impiden que la proteína se traduzca por completo (mutación de clase I). Estos fármacos consiguen que no se identifique este codón de parada prematuro, por lo que la proteína puede seguir su síntesis al completo. En segundo lugar, los denominados fármacos correctores del CFTR. Estos fármacos están diseñados para corregir el tráfico de la proteína con defectos en el plegamiento (mutación de clase II) hasta la membrana celular donde podría hacer su función casi con normalidad. En tercer lugar, los denominados potenciadores del CFTR. Estos fármacos tienen por diana la proteína CFTR que está en la superficie celular, con objeto de mejorar su función. Los fármacos potenciadores pueden actuar por tanto sobre las mutaciones de clases III, IV, V y VI. Actualmente, están en investigación numerosas moléculas con uno u otro mecanismo, habiendo llegado ya a comercializarse una de ellas. Ivacaftor es un potenciador del CFTR aprobado en España en Junio de 2015.

Estamos entrando en una nueva era en el manejo de la FQ. En lugar de enfoques que se centran en el tratamiento sintomático de las consecuencias de la enfermedad, existe una realidad emergente de terapias que tienen como objetivo el defecto genético subyacente. Entre ellas, se incluyen la terapia con moléculas, encaminada a corregir el defecto funcional a nivel de la proteína y la terapia génica, dirigida a corregir a alteración genética. Su utilización es interesante por su potencial teórico para modificar de una forma favorable la progresión de la enfermedad y reducir la considerable carga del tratamiento asociado al cuidado de la FQ.

### 1.2 REMODELADO ÓSEO

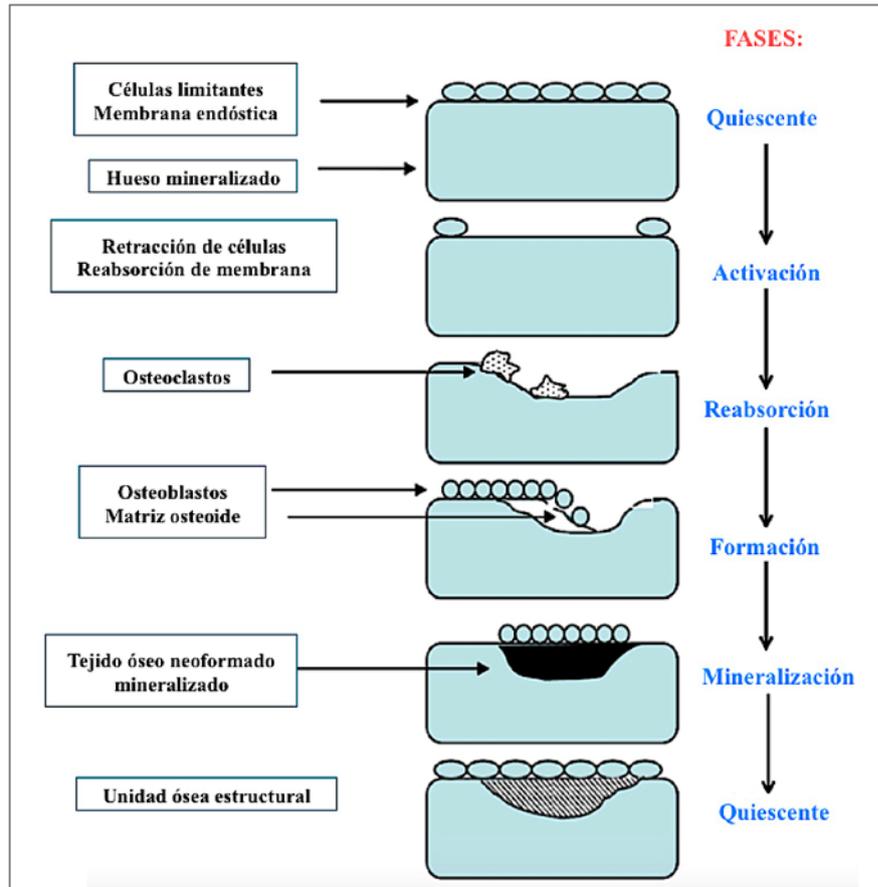
El tejido óseo, que se clasifica en compacto (denso) y esponjoso (trabeculado), constituye el sistema esquelético junto con el cartílago, y se compone de células y matriz extracelular (formada fundamentalmente por proteínas entre las que destaca el colágeno). Dentro de las células podemos encontrar: células osteoprogenitoras (precursoras de osteoblastos), osteoblastos (células formadoras de hueso), osteocitos (derivan de los osteoblastos y son células maduras rodeadas de matriz ósea), células de revestimiento óseo (derivan de los osteoblastos y tapizan el tejido óseo que no se está remodelando) y osteoclastos (célula que degrada, reabsorbe y remodela hueso).

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y resorción, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año. Aunque el hueso cortical constituye un 75% del total, la actividad metabólica es 10 veces mayor en el trabecular, ya que la relación entre superficie y volumen es mayor (la superficie del hueso trabecular representa un 60% del total). Por esto la renovación es de un 5-10% del hueso total al año (49) .

El remodelado óseo es un proceso dinámico de crecimiento y turnover óseo. La formación ósea y la reabsorción no ocurren de una forma randomizada a lo largo del hueso: son parte de un mecanismo de recambio por el que el hueso viejo es sustituido por el nuevo. La secuencia de procesos que tiene lugar en el remodelado es: activación-reabsorción-formación (ARF) (50). Durante la fase intermedia entre resorción y formación (fase de cambio) se observan en el lugar de remodelado algunas células macrófago-like, que forman una línea de “cemento”, la cual marca el límite de la reabsorción y actúa como “cemento” entre el hueso viejo y el nuevo. La duración de estas fases ha sido medida el ciclo completo de remodelado dura aproximadamente entre 3 y 6 meses. El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (basic multicellular units). La reabsorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado en condiciones normales, (51) tanto en el espacio como en el tiempo. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años.

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases. (Figura 6) (52):



**Figura 6. Fases del proceso de remodelado óseo.**

*Adaptado de Compston JE. Sex steroids and bone. Physiol Rev 2001;81:419-47.*

### **Fase quiescente**

Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

### **Fase de activación**

El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros, elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.

### *Fase de reabsorción*

Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- $\beta$  (factor transformante del crecimiento  $\beta$ ), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

### *Fase de formación*

Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (53). Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

### *Fase de mineralización*

A los 30 días del depósito de osteoide comienza la **mineralización**, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular. Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso.

En ausencia de enfermedad, la diferencia entre el corto periodo de resorción y el largo periodo de formación (espacio de remodelado) no provoca consecuencias estructurales relevantes. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre ambos procesos y se incrementa la frecuencia de activación de unidades de remodelado, el espacio de remodelado alcanza unas dimensiones considerables y puede

provocar aumento de la fragilidad ósea (muchas lagunas abiertas, sin que haya finalizado el proceso de relleno osteoblástico) (54).

### 1.2.1 FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.

El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

#### **1. Factores genéticos**

Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente (55). Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que la amarilla.

#### **2. Factores mecánicos**

La actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. El mecanismo por el cual el hueso detecta y traduce los estímulos físicos, y cómo estas señales se traducen en señales biológicas y de expresión génica, no se conoce en su totalidad, aunque se ha destacado el importante papel que tienen los osteocitos en este proceso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Y por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto deletéreo sobre el hueso, acelerando la reabsorción (56).

#### **3. Factores vasculonerviosos**

Se sabe desde los trabajos de Trueta (57) que la vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo, permitiendo el aporte de células sanguíneas,

oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. La vascularización constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. Igualmente, la neoformación vascular es el primer hecho en el fenómeno de la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la existencia de oxígeno es fundamental para que se produzca la restauración completa y no tejido fibroso. Ham en 1952 constató este fenómeno (58), al observar que los osteocitos se mueren cuando están lejos de un capilar (la distancia máxima es de 0.1 mm).

La inervación es necesaria para el normal fisiologismo óseo. El hueso es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales. Se han encontrado fibras autónomas en periostio, endostio, hueso cortical y asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkmann, así como neuropéptidos y sus receptores en el hueso. Como ejemplos de la importancia de la inervación en la fisiología ósea son la osteopenia y la fragilidad ósea presentes en pacientes con desórdenes neurológicos.

#### **4. Factores ambientales**

Que se pueden clasificar a su vez en factores nutricionales y no nutricionales.

##### **a) Nutricionales**

###### **Ingesta energética**

Una baja ingesta calórica se asocia con un retraso en el crecimiento, maduración y mineralización ósea.

###### **Aporte proteico**

La ingesta de proteínas es necesaria para la formación de la matriz ósea. En nuestro ambiente este no suele ser un problema, más bien al contrario, el aporte excesivo

de proteínas, al favorecer la hipercalciuria se ha postulado como un factor que podría fomentar la aparición de osteoporosis.

### **Calcio**

El aporte de calcio no depende sólo del contenido de calcio en los alimentos, sino también de su biodisponibilidad (por ejemplo, un 30% en la leche y un 5% en las espinacas) que puede disminuir en función del contenido de fibra, oxalatos y fitatos, así como de la relación Ca/P. Además también varía la capacidad de absorción en las distintas etapas de la vida, de forma que en la pubertad, no sólo está aumentada, sino que disminuye la eliminación de calcio en heces y orina, por lo que el balance cálcico es más positivo que en otras etapas de la vida.

De todos modos se desconoce cuál es la cantidad mínima de calcio a partir de la cual se afectaría de forma significativa la mineralización ósea. Se postula que el factor verdaderamente importante en la mineralización ósea no es la ingesta puntual sino la ingesta media desde el nacimiento, ya que puede ser posible que a partir de 800 mg, la capacidad absorbente del calcio no se pueda mejorar.

### **Fósforo**

Es un mineral con una alta biodisponibilidad (60-80%) y que está muy presente en los alimentos y no suele haber problema de déficit, más bien al contrario, que su excesiva ingesta disminuya la relación Ca/P, y así interferir en la absorción del calcio.

### **Vitamina D o 25 OH vitamina D**

Juega un papel fundamental al favorecer la absorción de calcio a nivel renal y digestivo. La dieta no es capaz de aportar las necesidades de esta vitamina y su principal fuente está en la transformación en la piel en la forma activa por las radiaciones solares.

### **b) No nutricionales**

Se conoce que hábitos tóxicos como tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia. Se ha demostrado que el sedentarismo reduce la mineralización ósea, mientras que el ejercicio la mejora. Sin embargo es difícil establecer una correlación entre actividad física y DMO (59).

## **5. Factores hormonales**

El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente de la hormona somatotropa u hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés growth hormone) y las hormonas calcitrópicas (parathormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D). Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino) (49).

Las hormonas más importantes que intervienen en la fisiología ósea son:

### **a) Hormonas tiroideas**

Las hormonas tiroideas aumentan la frecuencia de activación de las unidades de remodelado y por tanto aceleran la velocidad de recambio. En consecuencia, en el hipertiroidismo existe un incremento en las tasas de resorción y formación óseas, con predominio de la resorción, que conduce a la disminución de la masa ósea. Tanto los osteoblastos como los osteocitos parecen expresar receptores para estas hormonas. A nivel celular, se sabe que las hormonas tiroideas favorecen la osteoclastogénesis y ejercen influencias complejas sobre los osteoblastos, incluyendo el estímulo de la síntesis de IGF-I, IL-6 e IL-8 (60–62).

### **b) Parathormona (PTH)**

Es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiante por excelencia, al favorecer la reabsorción. No obstante, en los últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$  (63). Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

### **c) Calcitonina**

Es un polipéptido hormonal producido en las células C o parafoliculares del tiroides. Es un potente inhibidor de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos, pero sus efectos son transitorios. El osteoclasto escapa a los efectos de la calcitonina en una exposición continuada (64). Los pacientes tratados por hipercalcemia con calcitonina responderán sólo durante periodos limitados de tiempo (entre 48-72 horas) antes de que baje la hipercalcemia. El "fenómeno de escape" es ocasionado por una regulación a la baja del ARNm para el receptor. La calcitonina causa contracciones citoplasmáticas en las membranas osteoclasticas que se han correlacionado con su capacidad para inhibir la reabsorción (65).

### **d) 1,25 OH vitamina D o calcitriol**

La vitamina D, procedente de la dieta y, sobre todo, de la síntesis endógena en la piel, se hidroxila en el hígado en posición 25, formándose la 25 OH vitamina D o calcidiol. Este metabolito es después hidroxilado en el riñón en posición 1. Se origina

así la 1,25 OH vitamina D o calcitriol, que es el metabolito más activo y responsable de la mayoría de las acciones atribuidas a la vitamina D.

Sus acciones son similares a las de la PTH. Es una hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. A pesar de ser esencial para el normal crecimiento y mineralización ósea no estimula la formación de forma directa. Lo hace a través de la síntesis de la osteocalcina (sintetizada por el osteoblasto) y de acciones complejas. Inhibe directamente la síntesis de colágeno pero aumenta la unión de los IGF-I a sus receptores en las células del linaje osteoblástico. Además estimula la síntesis de las proteínas de unión a IGF las cuales pueden modificar sus acciones y concentraciones.

Algunos autores piensan que esta hormona puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos (66).

#### **e) Andrógenos**

Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Los andrógenos, de origen tanto suprarrenal como gonadal, actúan indirectamente sobre el crecimiento estimulando la secreción de GH, lo cual requiere la transformación previa de la testosterona en estradiol por acción de una aromatasa. También influyen directamente en el cartílago de crecimiento, donde estimulan la proliferación de condrocitos y la síntesis de matriz cartilaginosa. Esta acción promotora de la síntesis de la matriz se debe a la dihidrotestosterona, originada a partir de la transformación de la testosterona por la  $5\alpha$ -reductasa, actuando en sinergia con el calcitriol (67). Los andrógenos aumentan la expresión local del IGF-I (68,69).

La deficiencia androgénica se asocia a una menor densidad ósea, la administración

de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más altas.

### **f) Estrógenos**

Son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción y se ha descubierto que juegan un papel importante en el desarrollo esquelético tanto femenino como masculino durante la adolescencia. Son responsables del estirón puberal, actúan indirectamente favoreciendo la secreción de GH y, además, directamente sobre el cartílago de crecimiento donde existen receptores específicos; inducen la síntesis y mineralización de la matriz y, contrariamente a los andrógenos, inhiben la proliferación de condrocitos (67).

Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Diversos estudios han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de OPG, proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción (70), por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

Se sabe que la deficiencia de  $17\beta$ -estradiol afecta el metabolismo óseo tanto en humanos como en modelos de ratón (71). Curiosamente, ambos modelos de ratones con FQ con la mutación 489X y F508del en el gen CFTR muestran niveles más altos de hormona estimulante folicular, lo que sugiere una posible disminución en la producción de  $17\beta$ -estradiol (72).

### **g) Progesterona**

Es anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos,

que poseen receptores para la hormona o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.

#### ***h) Insulina***

Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I.

#### ***i) Glucocorticoides***

La presencia de glucocorticoides es necesaria para la diferenciación normal de muchas células, y probablemente también entre ellas las del hueso. Sin embargo, el exceso de glucocorticoides, endógenos o exógenos, tiene efectos profundos negativos sobre el esqueleto. De hecho, la causa más frecuente de osteoporosis secundaria es el tratamiento prolongado con estos compuestos.

Los glucocorticoides deprimen la actividad de las células de la línea osteoblástica: inhiben la replicación de sus precursores y favorecen la apoptosis. Por otro lado, disminuyen la síntesis de colágeno, osteocalcina e IGFs, y suprimen directamente la BMP-2 y el CBFA1 (Core-binding factor alpha 1) o también conocido como RUNX-2 (runt-related transcripcion factor 2), factores críticos para la osteoblastogénesis (73). Además, inhiben la expresión de integrinas, con lo que se dificulta su adhesión a la matriz y presumiblemente el depósito del osteoide. En cuanto a la resorción, en general se considera que tienden a incrementarla. Pueden modular la apoptosis de los osteocitos y la producción de RANKL y osteoprotegerina. En algunos estudios in vivo, se ha encontrado estimulación de la resorción. Además de las acciones directas sobre el tejido óseo, los glucocorticoides ejercen un efecto pro-resortivo indirecto, mediado por un incremento en la secreción de PTH (los corticoides inhiben la absorción intestinal de calcio y aumentan su eliminación renal), o en su actividad sobre el hueso, en relación con el aumento en la expresión de sus receptores. La disminución de la síntesis de hormonas sexuales que suelen presentar los pacientes

tratados con glucocorticoides también puede contribuir al desarrollo de osteoporosis (74,75).

### *j) Hormona del crecimiento (GH)*

Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

Desde hace unos años se viene considerando a la GH un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos (76), teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino.

### **6. Factores locales**

El remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y también se han implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales (tabla 4). Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.

**Tabla 4. Factores locales reguladores del remodelado óseo.**

	<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	<b>CITOQUINAS</b>
<b>(+) FORMACIÓN</b>	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (Factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF- $\beta$ (Factor transformante del crecimiento $\beta$ ) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	
<b>(+) REABSORCIÓN</b>	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de monocitos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	IL-1 (Interleuquina-1) IL-6 (Interleuquina-6) IL-8 (Interleuquina-8) IL-11 (Interleuquina-11) PGE <sub>2</sub> (Prostaglandina E-2) PGE <sub>1</sub> (Prostaglandina E-1) PGG <sub>2</sub> (Prostaglandina G-2) PGI <sub>2</sub> (Prostaglandina I-2) PGH <sub>2</sub> (Prostaglandina H-2)
<b>(-) REABSORCIÓN</b>		IFN- $\gamma$ (Interferón $\gamma$ ) IL-4 (Interleuquina-4)

**a) Factores de crecimiento**

Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular (tabla 4).

### ***Insulin-like Growth Factor I y II (IGF-I y II)***

Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz orgánica u osteoide (77). Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de *IGF-binding proteins*) que a su vez pueden ejercer efectos estimulatorios o inhibitorios sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. El IGF-1 es esencial para acoplar la biosíntesis de la matriz a la mineralización sostenida. Esta acción es probable que sea particularmente importante durante el arranque del crecimiento puberal cuando se requiere una formación ósea rápida y una consolidación (78). Algunos autores han sugerido que los niveles reducidos de IGF-I en suero podrían ser responsables, al menos en parte, del defecto de crecimiento informado en pacientes con FQ (79), que también se ha sido observado en modelos animales Knockout (Cftr  $-/-$ ) y Cftr  $-/F508$ ) (80).

El IGF-II puede alterar el tamaño y la naturaleza de la población de osteoblastos mediante la regulación de la apoptosis, y por lo tanto afectan el crecimiento óseo (81).

### ***Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )***

Los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo (los segundos, tras los IGF). Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica.

TGF- $\beta$  es un potente estimulador de la formación ósea, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas (entre las que destacan la metaloproteinasas de la matriz (MMP), enzima que degrada la misma). Asimismo, inhibe la reabsorción al reducir

la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimular su apoptosis (82).

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

Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- $\beta$ . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica (83). Canalis et al. (84) creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

### ***Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)***

Los factores derivados de las plaquetas inicialmente aislados de las plaquetas, también se sintetizan en tejidos normales o neoformados, lo cual indica que pueden actuar como reguladores locales o sistémicos del crecimiento de tejidos. El PDGF estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos (85) y por otro, favorece la reabsorción ósea. Otros efectos son la proliferación de fibroblastos, así como de células musculares lisas, la neovascularización y la síntesis de colágeno, por lo que favorece la cicatrización.

### ***Fibroblastic Growth Factor (FGF)***

El factor de crecimiento fibroblástico es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos. Como ejemplo práctico del efecto del FGF se sabe que las mutaciones

en sus receptores producen alteraciones del esqueleto craneofacial, como la acondroplasia, el síndrome de Apert y el síndrome de Crouzon, entre otras (86).

### ***Epidermal Growth Factor (EGF)***

El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. Se sintetiza en múltiples tejidos del organismo, por lo que podría estar involucrado en diversas funciones biológicas, aún no bien esclarecidas. Respecto al hueso podría tener una doble acción formadora y destructora, si bien ésta última es la más conocida.

### ***Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)***

El factor de crecimiento vascular endotelial induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular. Se produce en situaciones de hipoxia y actualmente se está considerando como uno de los factores claves en el desarrollo de las primeras fases del proceso de reparación de fracturas y regeneración ósea, así como en el desarrollo tumoral.

### ***Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)***

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos es importante para la osteoclastogénesis.

### ***Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF o CSF-1)***

El factor estimulante de colonias de macrófagos, es un factor de crecimiento de glicoproteínas que regula específicamente la supervivencia, proliferación y diferenciación de células de linaje monocito-macrófago a través de un receptor de superficie celular expresado selectivamente sobre estas células tipos, c-fms. El M-CSF es liberado por osteoblastos y células progenitoras de médula ósea que al unirse a su receptor, c-fms en pre-osteoclastos, activa una cascada intracelular que conduce a la proliferación de precursores y supervivencia de osteoclastos (87).

### **TNF Tumor Necrosis Factor (TNF)**

El TNF- $\alpha$  es una citoquina producido principalmente por macrófagos activados, pero también por otros tipos celulares tales como células T activadas, leucocitos polimorfonucleares, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y células de revestimiento óseo incluyendo osteoblastos.

El TNF- $\alpha$  estimula el desarrollo de los osteoclastos y funciona directamente e indirectamente al aumentar la producción de M-CSF por células estromales de médula ósea y disminuir la liberación del receptor de señuelo RANKL OPG por los osteoblastos, respectivamente. Estudios muestran que el TNF- $\alpha$  inhibe la diferenciación de los nuevos osteoblastos de las células precursoras. La regulación de RUNX2 por TNF podría disminuir el reclutamiento de los precursores de osteoblastos en el conjunto de hueso maduro que forman las células (88).

#### **b) Proteínas de la matriz**

Las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (89). Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares (90).

Por otro lado, estas proteínas de la matriz también participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. Por ejemplo el colágeno I es uno de los marcadores más tempranos que regulan las células osteoprogenitoras y la fosfatasa alcalina es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas.

### **c) Citoquinas**

Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como en la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino. En el hueso son importantes las siguientes:

#### ***Interleuquina 1 (IL-1)***

Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos (52). En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Ambas isoformas de IL-1 estimulan la producción de otras citoquinas y prostaglandinas y pueden inducir la expresión de RANKL y la producción de enzimas degradativas. Sin embargo, no induce directamente la osteoclastogénesis (91).

#### ***Interleuquina 6 (IL-6)***

Se ha reportado que la IL-6 estimula la resorción ósea mediante el aumento de la formación de osteoclastos a través de un mecanismo dependiente de RANKL (92). Juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis.

Se ha sugerido que la IL-6 es un importante mediador de la pérdida ósea patológica (93–98). El estrógeno disminuye la expresión de IL-6 en las células estromales / osteoblastos (99). Se ha implicado a la IL-6 en la disminución de la masa ósea que se produce en la osteoporosis postmenopáusica (93). Además, se han observado niveles elevados de IL-6 en una serie de otras afecciones caracterizada por pérdida excesiva de hueso, tales como la enfermedad de Paget (95), mieloma múltiple (96), artritis reumatoide (97) e hiperparatiroidismo (98).

En pacientes con FQ, el incremento en la producción de una serie de citoquinas pro-inflamatorias y pro-resortivas, ha sido reportado durante las exacerbaciones infecciosas y en algunos estudios se ha visto una correlación entre la pérdida de DMO y los niveles circulantes de estas citoquinas (100–102).

Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25 OH vitamina D.

Otras citoquinas osteoclastogénicas son, **IL-11** (que se produce en la médula ósea), la **IL-7** y la **IL-17**.

### **Interferón Gamma**

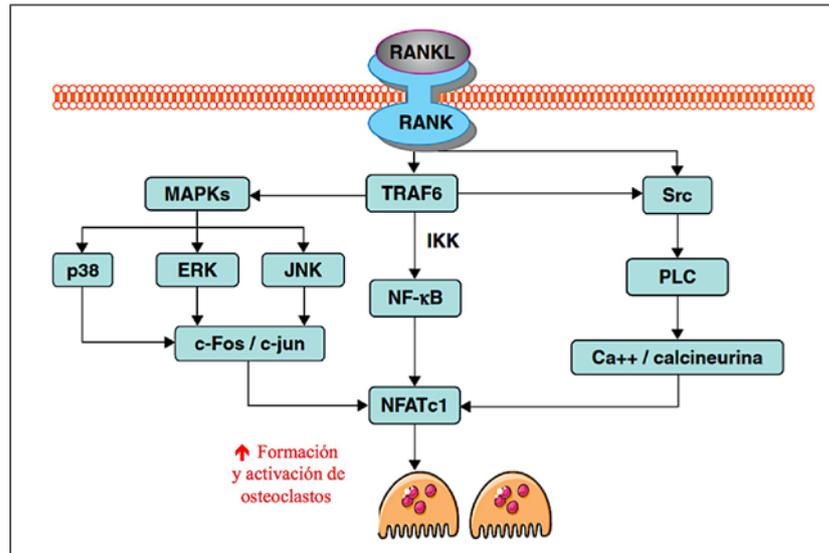
Es una linfoquina multifuncional producida por los linfocitos T activados. Ejerce una potente inhibición de la formación de osteoclastos, a la vez que estimula la síntesis de diversas citoquinas, entre ellas la IL-18 (103).

### **Prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT)**

Las prostaglandinas y los leucotrienos son mediadores basados en lípidos derivados de ácidos grasos que son producidos por diferentes tipos celulares como macrófagos, fibroblastos y células epiteliales gingivales [18]. La prostaglandina E (PGE), como la prostaglandina E<sub>2</sub>, la prostaciclina y la prostaglandina F<sub>2</sub>α estimulan la formación de osteoclastos a través de RANKL. Tienen un efecto directo sobre la formación de osteoclastos y también estimulan la formación ósea. La prostaglandina E<sub>2</sub> se ha relacionado con la estimulación del factor de crecimiento de la insulina-tipo1, que promueve la síntesis de colágeno por los osteoblastos, lo que mejora la formación de hueso (104). Los leucotrienos son otra clase de mediadores lipídicos inflamatorios y estimulan la quimiotaxis de los leucocitos y la generación de superóxidos en los neutrófilos. Los leucotrienos tales como LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTDE<sub>4</sub> mejoran la formación de osteoclastos y la activación de osteoclastos maduros mediante un mecanismo independiente de RANKL.

En la regulación del fenómeno de remodelación es de gran importancia el **sistema RANK-RANKL-OPG**. El RANK es un receptor de la familia TNFR presente en los osteoclastos, al que se une el RANKL (o ligando del RANK, de la familia del TNF) presente en la membrana de las células de estirpe osteoblasto/estroma medular. Como consecuencia de dicha unión, aumenta la proliferación y actividad de los osteoclastos, al tiempo que disminuye su apoptosis. La OPG es un receptor osteoblástico, miembro también de la familia TNFR, carente de dominio transmembrana, que, por ello, es secretado al exterior. Su ligando es el propio RANKL, de manera que puede decirse que se interpone entre él y el RANK, con lo que, por tanto, impide su puesta en contacto (se comporta como un receptor “señuelo” o “trampa”). Es decir, el osteoblasto produce tanto el activador de los osteoclastos como una sustancia que neutraliza dicho activador. En general, los mismos factores que estimulan uno, inhiben el otro. En definitiva, lo que determina la cantidad de hueso a resorber es la relación RANKL/OPG. Las células T expresan RANKL, del que pueden segregar una forma soluble. El sistema RANK-RANKL-OPG se considera en gran medida la “vía final común” de numerosos factores resorptivos. La PTH, el 1,25 OH vitamina D, las hormonas tiroideas, la IL-1, el TNF $\alpha$ , la IL-6, la PGE2, la IL-11, etc., aumentan la relación RANKL/OPG; los estrógenos desarrollan el efecto contrario. Cuando RANKL se fija a su receptor (RANK), presente en la membrana de los precursores osteoclasticos, induce una serie de señales que promueven la diferenciación de estos y la formación de osteoclastos (105,106). Se activan diferentes vías de señalización en el precursor de osteoclastos que inducen la expresión de genes, promoviendo la diferenciación y activación. Tras el contacto, la parte citoplasmática de RANK interacciona con proteínas adaptadoras conocidas como TRAF (factor asociado con el receptor TNF). Estas proteínas son de vital importancia. Tal es así que modelos murinos knock out para TRAF6, en los que se bloquea la expresión de este gen, desarrollan osteopetrosis al carecer de osteoclastos (107). Las TRAF inician la cascada de

señales, a través de la activación de varias vías, incluyendo NFκB (factor nuclear Kappa Beta), JNK (quinasa N-terminal c-Jun) y Src (proteína derivada del protooncogen src, que activa a tirosin quinasas). La vía NFκB, quizás la más importante de las tres, implica la traslocación del factor de transcripción NFκB al núcleo, liberándolo de los complejos IKK (Inhibidor κB quinasa) que lo retienen en el citoplasma, donde es inactivo. Por otro lado, la estimulación de la vía JNK promueve la formación y activación del complejo AP-1, formado por c-Fos y c-Jun. De forma conjunta, AP-1 y NFκB son capaces de inducir la expresión del factor de transcripción NFATc1 (nuclear factor of activated t cells, cytoplasmic 1, por sus siglas en inglés). Al igual que ocurre con el factor de transcripción NFκB, NFATc1 debe traslocarse al núcleo para llevar a cabo su función. Para ello es necesario activar la vía de Src. A través de la estimulación de esta vía se consigue un aumento de los niveles intracelulares de calcio. El aumento del calcio provoca la activación de la calcineurina, que cataliza la eliminación de un grupo fosfato de NFATc1. Esta defosforilación es la que promueve finalmente la traslocación de este factor al núcleo. Allí NFATc1 induce la expresión de diversos genes implicados en la osteoclastogénesis (105–108). NFATc1 coopera con otros factores de transcripción para inducir los genes específicos de los osteoclastos, como fosfatasa ácida resistente a tartrato, receptor de calcitonina y catepsina K (109). La figura 7 (110) muestra las vías de señalización de RANK.



**Figura 7 Vías de señalización de RANK.**

*Adaptado de Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. Reumatol Clínica. 2011 Sep 1;7:1-4.*

El paso clave inicial en la actuación del RANK es la unión de los TRAF a lugares específicos de su dominio intracelular. El osteoblasto produce, además del RANKL, otra sustancia necesaria para la osteoclastogénesis, el M-CSF, que se une al receptor c-fms presente en los precursores de los osteoclastos. Aunque RANKL y M-CSF son factores importantes para la osteoclastogénesis, el proceso requiere más moléculas coestimuladoras. Entre ellas están varias proteínas con estructuras que contienen un motivo ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) e ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) (111).

En primer lugar, para la osteoclastogénesis se requieren las moléculas adaptadoras que contienen ITAM, la proteína activadora de DNAX 12 (DAP12) y la cadena y común del receptor Fc (FcRγ). FcRγ y DAP12 se asocian con receptores de membrana plasmática tales como el receptor activador específico de osteoclastos (OSCAR: osteoclast-specific activating receptor), o el receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (TREM2: triggering receptor expressed on myeloid cells) (112). Los ligandos para estos receptores son actualmente desconocidos. Sin embargo, los datos de cultivos in vitro sugieren que los receptores asociados con

Fcγ son activados por ligandos expresados por osteoblastos, mientras que los asociados con DAP12 son activados por ligandos expresados en células precursoras de osteoclastos y, posiblemente, también por ligandos sobre osteoblastos. Una vez que ITAM es activado vía fosforilación, a nivel intracelular la señalización calcio-calcineurina es iniciada, que, en cooperación con la señal RANKL, es fundamental para NFATc1 inducción y osteoclastogénesis (109,112–115).

En segundo lugar, ITAM y ITIM son importantes para la señalización del receptor Fcγ (FcγR). Recientemente, todos los FcγRs se han demostrado en osteoclastos humanos, y la asociación de los FcγRs activados por sus ligandos que se hallan en la superficie de los osteoclastos, estimulan osteoclastogénesis (116).

La homeostasis ósea está controlada por varias vías de señalización (117). Las principales vías que participan en la diferenciación de osteoblastos incluyen miembros del factor de crecimiento de fibroblastos y proteínas de la proteína morfogénica ósea y la vía de señalización Wnt (wingless e Int) (117,118). Correspondientemente, dos factores importantes de transcripción, RUNX2 y factor de transcripción específico de osteoblasto (osterix u OSX), se expresan en osteoblastos, ambos esenciales y suficientes para la diferenciación de osteoblastos (118,119).

El hueso debe ser reemplazado constantemente para preservar su fuerza e integridad. La remodelación ósea está organizada por dos actividades en conflicto; la formación de hueso por los osteoblastos, que produce la matriz ósea orgánica, y la resorción ósea por osteoclastos, que disuelve el mineral óseo y la matriz extracelular (120,121). La osteogénesis y la angiogénesis son dos procesos estrechamente asociados que intervienen en el crecimiento óseo, la remodelación y la reparación (122).

### 1.3 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO

Como se ha mencionado anteriormente, el tejido óseo sufre un constante proceso de recambio en el que participan el osteoclasto, protagonista de la resorción ósea, y el osteoblasto, responsable de la fase compensadora de formación. El ciclo de remodelado óseo se completa en un período de 3-6 meses, predominando la fase formativa sobre la resortiva. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre ambos fenómenos. Sin embargo, cuando ocurre un desacoplamiento por predominio de la resorción, se produce pérdida de masa ósea, proceso común en la osteoporosis (123).

En la evaluación clínica del paciente con osteoporosis es esencial la medición cuantitativa de la densidad mineral ósea (DMO), que, al tratarse de un parámetro estático, no aporta información del ritmo de recambio óseo. En cambio, los marcadores bioquímicos del remodelado óseo nos ofrecen un análisis dinámico y global del esqueleto (124). Por lo que la utilización de los marcadores bioquímicos para la evaluación dinámica del recambio óseo que, en asociación con la densitometría, cuyas medidas son obtenidas por absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) permite una evaluación más completa del estado de masa ósea (125).

La matriz orgánica del hueso está constituida por colágeno tipo I en un 90%. Durante el proceso de degradación extracelular se liberan péptidos de los extremos carboxi y aminoterminal de las moléculas de protocolágeno, que son los que pasan al torrente sanguíneo (126). Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo miden estos productos generados durante el proceso de formación o degradación de la matriz ósea y pueden determinarse en sangre y orina. Su análisis repetido en intervalos cortos permite una evaluación del recambio óseo de forma seriada. Los marcadores óseos que miden la actividad osteoblástica se denominan de formación

y los que derivan del número o la actividad de los osteoclastos son los llamados marcadores de resorción (127). Los principales se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Muestra los principales marcadores de remodelado óseo.**

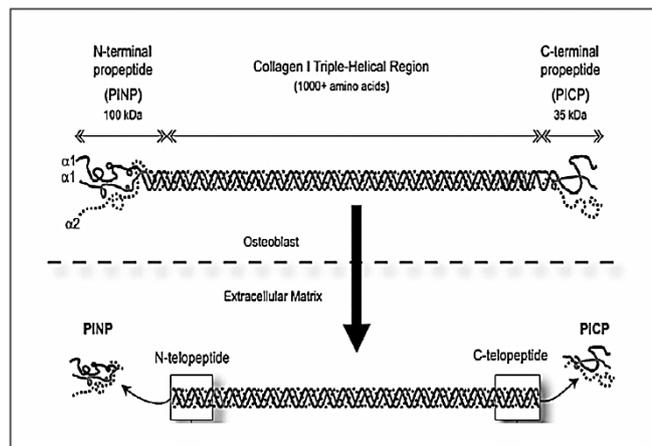
<b>MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO</b>	
<b>DE FORMACIÓN</b>	<b>DE RESORCIÓN</b>
<b>Suero</b>	<b>Suero</b>
Propéptido N-terminal del procolágeno tipo 1 (P1NP)	Telopéptido amino y carboxiterminal del colágeno tipo I (NTX, CTP)
Propéptido C-terminal del procolágeno tipo 1 (P1CP)	$\beta$ -CrossLaps ( $\beta$ -CTX)
Fosfatasa alcalina total (FAT)	Fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP)
Fosfatasa alcalina ósea (FAO)	Interleuquinas: IL-1, IL-6
Osteoprotegerina (OPG)	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )
Osteocalcina (OC)	Parathormona (PTH)
	25 OH Vitamina D y 1,25 OH vitamina D
	<b>Orina</b>
	Calcio/creatinina
	Hidroxiprolina
	Piridolina/Deoxipiridinolina
	Telopéptido amino y carboxiterminal del colágeno tipo I (NTX, CTP)
	$\alpha$ -CrossLaps ( $\alpha$ -CTX)

***Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1 (P1NP) y propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo 1 (P1CP)***

Los propéptidos de procolágeno derivan del colágeno tipo I, principal proteína extracelular de la matriz ósea. Aunque el colágeno tipo I no es exclusivo del hueso, el que se encuentra en tejido óseo tiene ciertas características propias. Es un heterodímero constituido por dos cadenas  $\alpha$ 1 (I) y una cadena  $\alpha$ 2 (I) que presenta una larga cadena media helical y dos regiones cortas no helicoidales propeptídicas a cada extremo de la cadena. Los osteoblastos sintetizan el colágeno tipo I en una fase temprana de su diferenciación. El preprocolágeno en el retículo endoplasmático rugoso pierde la fracción N-terminal y se transforma en procolágeno el cual será modificado post-traslacionalmente por varias enzimas específicas del tejido óseo.

## Introducción

Mientras la glicosilación ocurre en la fracción C-terminal, la fosforilación ocurre en el extremo N-terminal de los propéptidos. Las tres cadenas alfa se ensamblan mediante puentes disulfuro dando el propéptido de colágeno tipo I que se caracteriza por tener largas extensiones terminales propeptídicas amino (N-) y carboxilo (C-) terminal. El propéptido C-terminal (P1CP) es globular y el propéptido N-terminal (P1NP) es parte globular y parte helical (128). El P1CP es separado en primer lugar por la BMP1 (129), mientras el P1NP es liberado luego por otras enzimas. El colágeno tipo I se incorpora a la matriz ósea y los propéptidos pasan a la circulación donde pueden evaluarse como marcadores de formación por inmunoensayos específicos (130) (Figura 8).



**Figura 8. Representación esquemática de la molécula de colágeno tipo 1 y formación de P1NP y P1CP.**

*Adaptada de Herrmann M et al. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2008 Jul 17;393(2):57-75.*

Hay que tener en cuenta que no todo el procolágeno tipo I circulante procede del hueso, ya que también es un componente de la piel, las encías, los tendones, el cartílago, el intestino, etc, lo que hace que estos marcadores sean menos específicos que la osteocalcina o la fosfatasa alcalina ósea.

Estas extensiones de péptidos de procolágeno tipo 1 pueden ser detectadas por enzimoimmunoanálisis donde se reconoce la terminación carboxilo de los péptidos

liberados y reflejan la cantidad de matriz ósea sintetizada. La cuantificación de PICP y el PINP dan una idea de la velocidad de síntesis del colágeno tipo I. El P1NP es un marcador muy específico y sensible para ciertas enfermedades del metabolismo óseo como la osteoporosis y la enfermedad de Paget. Presenta además un insignificante ritmo circadiano y no está sujeto a influencias dietarias. Mientras el P1CP es el que más se ha utilizado en los estudios de FQ, es un marcador que está siendo desbancado por el P1NP, con un mayor rendimiento diagnóstico.

### ***Fosfatasa alcalina total (FAT) y fosfatasa alcalina ósea (FAO)***

La fosfatasa alcalina es una glicoproteína tetramérica que pertenece a una gran familia de proteínas unidas a las membranas celulares plasmáticas mediante un grupo glicano-fosfatidil-inositol carboxilo terminal. Esta glicoproteína está implicada en la mineralización ósea producida por los osteoblastos y que refleja su grado de actividad (131). Es liberada a la circulación donde sus concentraciones proporcionan información sobre la renovación ósea en curso (132). La fosfatasa alcalina tiene una vida media de 1-2 días, lo que contribuye a que su variación diurna sea mínima. Se conocen 5 isoenzimas diferentes (hepática, renal, ósea, intestinal y placentaria), y su actividad en el plasma resulta de la suma de las cinco. Además, ciertos tumores pueden expresar formas macromoleculares de FA (133,134). Las isoformas hepáticas y las óseas son las más abundantes, y su diferencia estriba en su patrón de glucosilación. En los adultos con función hepática normal, aproximadamente el 50% de la actividad FAT en suero se deriva del hígado, mientras que el 50% surge del hueso. En los niños y adolescentes, la isoenzima específica del hueso predomina (hasta el 90%) debido al crecimiento esquelético.

La fosfatasa alcalina pueden determinarse fácilmente por muchos inmunoensayos comerciales en el laboratorio de rutina (135). Por su fácil realización y bajo costo se continúa utilizando para evaluar cambios en el remodelamiento en sujetos con función hepática normal. Contrariamente, es un muy buen marcador óseo para

determinar la actividad y realizar el seguimiento terapéutico de la enfermedad de Paget (136). La FAO es útil para detectar el incremento del remodelado óseo durante la postmenopausia (136). En la actualidad, la sensibilidad y especificidad clínica de FAO se ha incrementado por la disponibilidad comercial de inmunoensayos con anticuerpos monoclonales específicos.

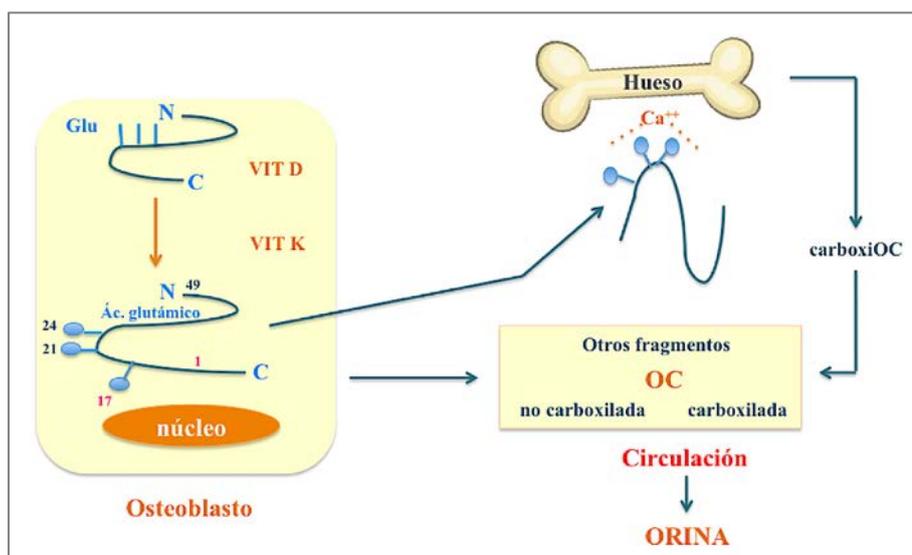
### ***Osteoprotegerina (OPG)***

La OPG, también conocida como factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF) o como TNFRSF11B, es un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que tras su síntesis no permanece anclada en la membrana, sino que es secretada a la circulación (137). Es una proteína expresada en una variedad de tejidos (sistema cardiovascular, pulmón, intestino, riñón, células hematopoyéticas e inmunocitos) y en las células osteoblásticas del hueso (138). La actividad biológica de OPG contrarresta los efectos de RANKL al actuar como un receptor señuelo de este último. De esta manera, al competir con la unión de RANK y RANKL, la OPG inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos y disminuye la resorción ósea (139). En modelos animales, la sobreexpresión de OPG bloquea la producción de osteoclastos y origina osteopetrosis (140). Por el contrario, la delección de OPG favorece un aumento del remodelado óseo con predominio de la resorción que origina osteoporosis (141). Por lo tanto, las expresiones de RANKL y OPG están coordinadas para regular la diferenciación y activación de los osteoclastos, y ambos funcionan como factores reguladores esenciales en el metabolismo óseo.

### ***Osteocalcina (OC)***

La OC es el constituyente proteico no colágeno más importante de la matriz ósea con un porcentaje que ronda el 15%. Corresponde a un pequeño péptido de 49 aminoácidos sintetizado por los osteoblastos en los últimos estadios de la formación ósea como una molécula precursora llamada pro-osteocalcina y bajo el control de

la vitamina D. Este propéptido contiene tres residuos de ácido glutámico (glu) en las posiciones 17, 21 y 24 que se carboxilan postraslacionalmente a ácido carboxiglutámico (gla) en una reacción dependiente de vitamina K. La fracción propeptídica se elimina de la molécula al mismo tiempo que la proteína carboxilada se vuelca al espacio extracelular donde se une a la hidroxiapatita vía  $Ca^{++}$  a través de los residuos de gla (128) (Figura 9).



**Figura 9 . Metabolismo de la osteocalcina.**

Al ser liberada por los osteoblastos, la OC se incorpora a la matriz ósea y se secreta al flujo sanguíneo. Como consecuencia de ello, el nivel sérico (o plasmático) de la OC se encuentra relacionado con la velocidad de recambio óseo, lo cual se manifiesta particularmente en el caso de la osteoporosis.

La OC es considerada un marcador de la velocidad de recambio óseo. En la sangre se encuentran tanto la OC intacta, como otros fragmentos. La OC intacta es inestable, mientras que existen otros fragmentos más estables y fáciles de detectar. Se han introducido inmunoensayos en dos sitios, que utilizan anticuerpos que detectan diferentes partes de la molécula de OC (142). Por otra parte, la medición de OC no carboxilada es considerada un índice de deficiencia de vitamina K y podría jugar un rol en el futuro, para predecir la masa ósea y el riesgo de fracturas (143).

### ***Telopéptido amino y carboxiterminal del colágeno tipo I (NTX, CTP)***

La degradación de la matriz ósea es esencial para que se produzca el remodelamiento óseo. Dos tipos de enzimas proteolíticas se encuentran involucradas en dicho proceso, la catepsina K lisosomal y las MMPs cuya actividad depende del estado de remodelamiento y del tipo de hueso a ser remodelado (144).

Actualmente se considera que la catepsina K, cuya actividad es máxima a pH ácido, es la principal colagenasa del proceso de resorción ósea. Esta enzima es capaz de degradar al colágeno en varios sitios dando lugar a pequeños péptidos N- y C-terminales, dejando así expuesta a la molécula de colágeno para la acción de otras colagenasas que actúan a pH neutro, entre ellas las MMPs (145).

El CTP fue el primer marcador que pudo determinarse en la región carboxiterminal, pero se observó a posteriori, después de diversos estudios que presentaba una escasa sensibilidad y especificidad diagnóstica.

En la actualidad se considera a los telopéptidos N- y C-terminal, conocidos como NTX y CTX, respectivamente, como los marcadores más sensibles y específicos de la resorción ósea. Estos fragmentos se forman por la actividad de la catepsina K y aparecen en cantidades significativas, tanto en sangre como en orina, donde pueden medirse por inmunoensayos específicos. La medición sérica proporciona una ventaja con respecto al ensayo en orina porque evita el efecto aditivo de la variabilidad biológica de la excreción de creatinina urinaria (146).

Han mostrado una correlación significativa con la densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas (147).

### ***$\beta$ -Crosslaps ( $\beta$ -CTX)***

Son fragmentos telopeptídicos 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 (148). 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 (149–151).

Otros marcadores utilizados en este trabajo como la PTH, la 25 OH vitamina D y la 1,25 OH vitamina D, la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ , son descritos en el apartado 1.2.1. (Factores reguladores del remodelado óseo).

### 1.3.1 MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN LA EDAD PEDIÁTRICA

El crecimiento y la mineralización del esqueleto es un proceso continuo que tiene lugar durante la infancia, pubertad y adolescencia (152). La acumulación de masa ósea es un proceso dinámico entre las fuerzas que forman hueso (depósito) y las que incitan su pérdida (resorción). Es preciso un equilibrio entre ambos fenómenos para el crecimiento y mantenimiento del hueso (153) .

La adquisición de masa ósea resulta de la interacción de varios factores (genéticos, raciales, nutricionales, hormonales, estilo de vida y actividad física). El factor genético determina hasta el 80% de la DMO en jóvenes y el 20% restante es debido a factores exógenos (154). Durante el periodo de crecimiento, la masa ósea aumenta hasta alcanzar un valor máximo poco después de la pubertad (155).

## Introducción

Después de alcanzar la masa ósea máxima, la remodelación es el proceso dominante durante toda la vida. Durante la adolescencia, la formación ósea es mayor que la resorción, lo que conduce a un aumento de la masa ósea (156). En consecuencia, es durante esas épocas de la vida cuando pueden producirse situaciones de osteopenia que condicionen la aparición temprana de patología osteoporótica en la edad adulta (157).

El desarrollo del esqueleto humano comienza en la vida embrionaria temprana mediante la diferenciación de las células en condrocitos (células formadoras de cartílago). La velocidad del crecimiento esquelético (que puede ser medida por los MRO) es alta inmediatamente después del nacimiento hasta los 2-3 años (etapa donde se adquiere un 25% del pico de masa ósea), se desacelera por un tiempo breve (158,159) y aumenta nuevamente más tarde en la infancia. A partir de los 10 años, en niñas ocurre un incremento tanto de la DMO como el contenido mineral óseo (CMO) hasta los 14 años, para enlentecerse a los 16 años y prácticamente cesar 2 años más tarde. En niños, el periodo de máxima mineralización es más tardío y prologado abarcando desde los 13 a los 17 años, continuando hasta los 20 años aunque a un ritmo más lento. Al llegar al estadio puberal V (o estadio de Tanner V, edad  $\geq 14$  años), aún existen ganancias en la DMO en niños, pero no en las niñas. En general a los 18 años se ha alcanzado un 90% del pico de masa ósea (59,160,161).

El desarrollo puberal se caracteriza por una mayor producción de esteroides sexuales por parte de las gónadas. Sin embargo, el estradiol y la testosterona son importantes no solo para el desarrollo puberal, sino también para el crecimiento puberal (162–164) y para el mantenimiento de la masa ósea durante la vida adulta (162,164). En este contexto, un vínculo entre el desarrollo puberal y el sistema esquelético se conoce desde hace mucho tiempo.

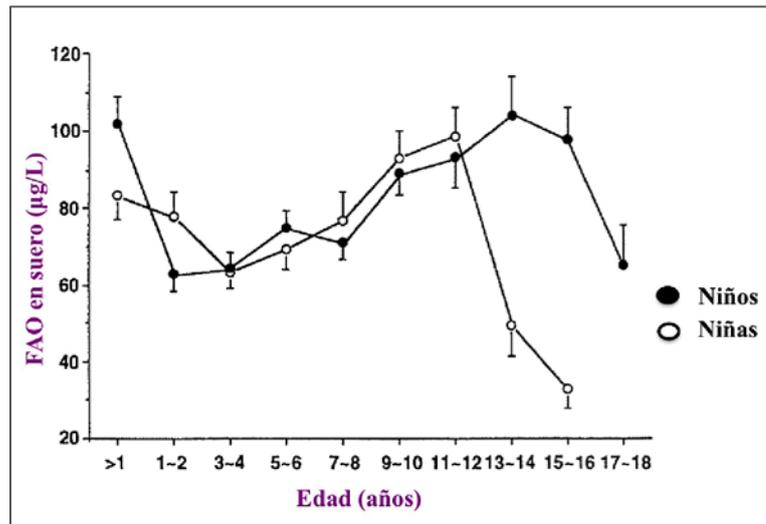
De hecho, los estudios han demostrado que las concentraciones de marcadores de formación ósea alcanzan su máximo durante el crecimiento puberal y disminuyen durante la pubertad tardía (164–169).

Los marcadores óseos circulantes o excretados en orina son significativamente afectados por factores fisiológicos (edad, sexo, velocidad de crecimiento, estado nutricional y pubertad) y patológicos (prematurez, deficiencia de la hormona del crecimiento, desnutrición, malabsorción, deficiencia de vitamina D y enfermedad ósea metastásica) especialmente en niños que, en comparación con adultos, han elevado dramáticamente las concentraciones de marcadores óseos debido a la alta velocidad de crecimiento esquelético y el rápido recambio óseo (135,170,171). La evaluación bioquímica de los marcadores del recambio óseo puede ser importante en el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad del metabolismo óseo (172). Estos marcadores pueden evaluarse en muestras de suero y orina. En comparación con los adultos, en los niños, es difícil recolectar muestras confiables en serie, especialmente a partir de recolecciones completas de orina en el tiempo. Para ajustar esos datos, a menudo se normalizan y se informan como proporción de analito/creatinina (135). Esta relación en sí misma está limitada por una variación biológica considerable y un cambio en los niveles de creatinina con la edad a medida que aumenta la masa muscular (165). Por esta razón, es preferible medir marcadores bioquímicos óseos en muestras de suero.

En adultos, FAO es una herramienta de diagnóstico más sensible que la actividad FAT; un pequeño aumento es fácilmente detectable y señala la existencia de una posible patología (173). En los recién nacidos de muy bajo peso al nacer, los niveles de FAT y FAO aumentan de manera similar después del nacimiento, pero ninguno predice la tasa de aumento en el contenido mineral óseo (174). En niños y adolescentes en rápido crecimiento, la FAO aumenta hasta la pubertad media y disminuye en la pubertad tardía (en niñas, después de la menarquia) (Figura 10),

pudiendo observar que las mujeres tuvieron sus niveles pico de FAO en suero durante la pubertad unos 2 años antes que los hombres (175,176), coincidiendo con el estadio Tanner II (11-12 años de edad) en niñas y el estadio Tanner III (13-14 años de edad) en niños (131).

En las niñas en pubertad, la FAO es aproximadamente 10 veces mayor que los valores de adultos, mientras que la FAT es 5 veces mayor (177).



**Figura 10. Niveles de FAO en niños normales (círculos rellenos) y femeninos (círculos vacíos) en función de la edad.**

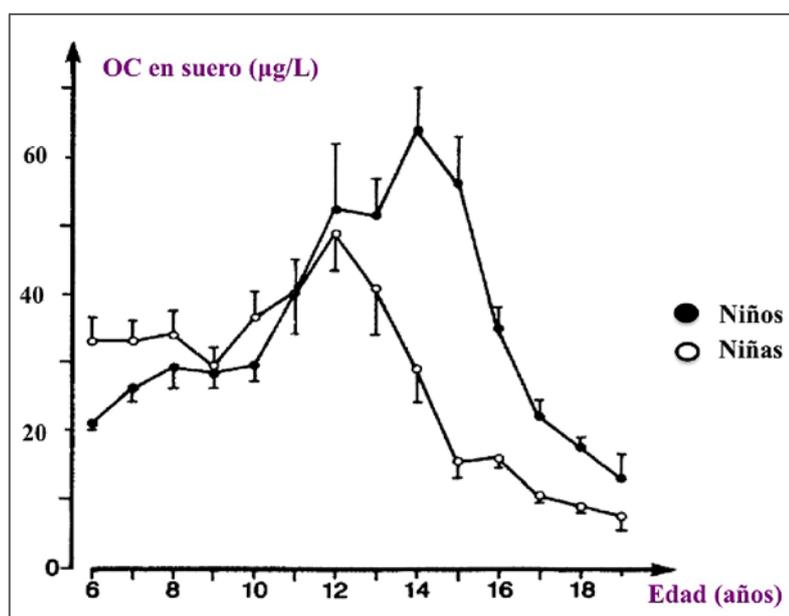
*Adaptado de Tobiume H, et al. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Jul;82(7):2056-61.*

En un estudio realizado por Gennai I. et al. (178) se determinaron niveles de FAO en 1502 niños de entre 6 meses a 16 años de edad (686 mujeres y 816 varones) durante un período de seis años. Se estudió el efecto de la edad, el sexo, la pubertad basado en la evaluación del estadio de Tanner. En el sexo masculino, se pudo observar una diferencia significativa entre el estadio I y los otros estadios de Tanner ( $p < 0.001$ ) para la FAO.

Las concentraciones más altas para ambos marcadores se pueden encontrar en la etapa III. En ambos sexos se pudo observar una diferencia significativa entre el

estadio I y los otros estadios de Tanner ( $p < 0.001$ ) para la FAO. A diferencia de los hombres, las concentraciones más altas se pudieron encontrar antes en los estadios II y III. Las concentraciones más bajas se pudieron observar para el estadio I en hombres y para el estadio V en mujeres. Se pudo observar un aumento significativo para FAO en ambos sexos en Tanner II y III, con una disminución en el estadio IV en las mujeres, coincidiendo con lo anteriormente expuesto.

Otro marcador de formación ósea estudiado ha sido la osteocalcina, que se ha investigado durante la pubertad y el crecimiento puberal en humanos previamente: se han descrito concentraciones máximas de osteocalcina en adolescentes en los estadios III (edad 11-12,5 años) y IV (edad 12,5-14 años) de Tanner en ambos sexos (167,179,180) (Figura 11).



**Figura 11. Niveles de OC en niños y niñas normales en función de la edad.**

*Adaptado de Marazuela M, et al. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. Calcif Tissue Int. 1993 Jul 1;52:419-21.*

Van Coeverden M. et al. (181), realizan determinaciones de marcadores de remodelado óseo, siendo uno de ellos la osteocalcina. La población de estudio fue de 155 niños sanos ( $12,0 \pm 1,5$  años; rango de edad 8,8 - 15,7 años) y 151 niñas

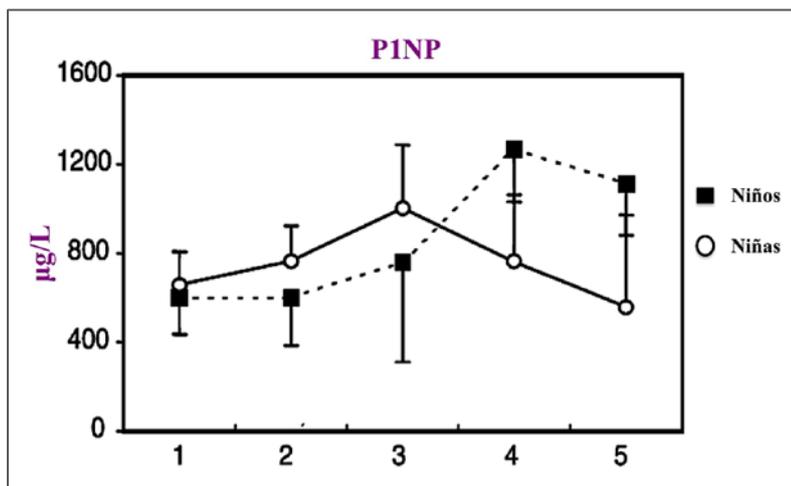
sanas ( $11,2 \pm 1,6$  años; rango de edad 8,2 - 14,0 años). El nivel máximo observado de OC en niños se encontró en el estadio IV y en niñas en el estadio III. El aumento de OC desde la pre pubertad o estadio I hasta el valor máximo fueron significativos en ambos sexos. Desde los valores pico hasta el final de la pubertad, se observa una disminución significativa en las niñas.

Recientemente se ha descubierto que la osteocalcina estimula la producción de testosterona en células de Leydig en un modelo de ratón, lo que implica que la osteocalcina desempeña un papel no solo en el crecimiento puberal (166) sino también en el desarrollo puberal masculino (162,182). Aunque los niveles de osteocalcina cambian durante el desarrollo puberal femenino, no parece existir una influencia similar de la osteocalcina sobre el desarrollo gonadal y la expresión hormonal en las mujeres (167,183).

La OC también exhibe efectos metabólicos: mejora de la secreción de insulina del páncreas, mejora de la sensibilidad sistémica a la insulina, en particular en el músculo esquelético, además de la estimulación de la actividad endocrina global de la célula de Leydig mencionada anteriormente.

El marcador de formación ósea P1NP fue estudiado por Lehtonen M. et al. (168), en 155 niñas caucásicas en rango de edad de 9-15 años. Los resultados mostraron las concentraciones más elevadas entre las niñas prepúberes y en la pubertad temprana y disminuyeron en la pubertad tardía.

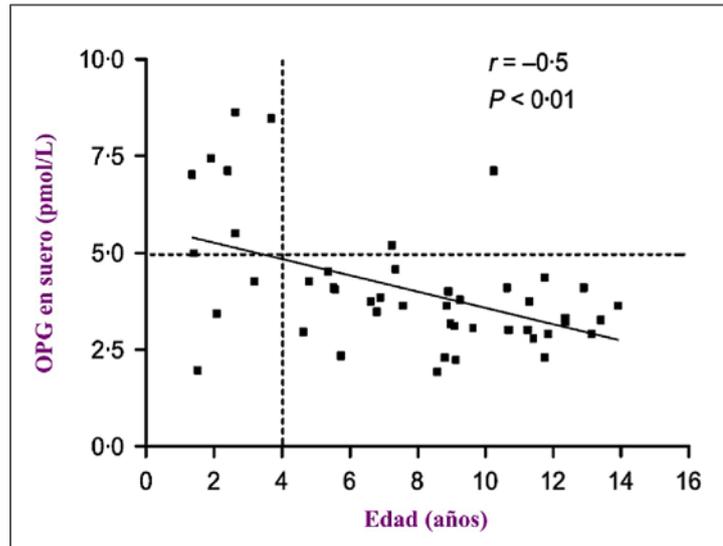
Van Coeverden M et al (181), también realizaron determinaciones de P1NP, observando los mismos resultados que para la osteocalcina. Pico máximo en el estadio IV para niños y en el estadio III para niñas. Aumento desde la prepubertad o estadio I hasta el valor máximo con significación estadística en ambos sexos. Desde los valores pico hasta el final de la pubertad, se observa una disminución significativa en las niñas (Figura 12).



**Figura 12. Niveles medios ( $\pm$  SD) de los marcadores de PINP en las cinco etapas puberales en niños y niñas.**

*Adaptado de Van Coeverden et al. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. Clin Endocrinol (Oxf). 2002 Jul;57(1):107–16.*

Buzi F. et al (184), abordan en su estudio la determinación de los niveles de OPG en una población de 46 niños sanos (21 niños y 25 niñas) comprendidos en el rango de edad de 1 a 14 años con un predominio entre las edades de 7 a 12. La concentración media de OPG en el grupo como un todo fue de 4,05 pmol/L (DE 1,63); el valor medio de OPG en niños fue de 4,24 pmol/L (DE 1,63) y de 3,89 pmol/L (DE 1,26) en las niñas, sin diferencias significativas entre sexos. No se encontraron diferencias en los niveles de OPG entre los sujetos prepúberes (n = 41) y puberales (n = 5), aunque estos últimos fueron demasiado pocos para sacar conclusiones a este respecto. Las concentraciones séricas de OPG disminuyeron significativamente con la edad ( $r = -0,5$ ,  $P < 0,01$ ); en particular, podríamos distinguir visualmente dos grupos de edad que parecían diferir significativamente: los niños de 1-4 años mostraron niveles de OPG  $\geq 5$  pmol/L en más del 50% de los casos, mientras que en los niños mayores solo en el 6% fueron niveles de OPG mayor que 5 pmol/L (Figura 13). Esta diferencia se confirmó mediante una prueba t entre los dos subgrupos, que mostró niveles de OPG significativamente mayores en niños de 1 a 4 años ( $5,87 \pm 2,22$  frente a  $3,55 \pm 0,97$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 13. Correlación entre las concentraciones séricas de OPG y la edad en sujetos normales.**

Las líneas punteadas separan los niveles de OPG <5 y  $\geq$  5 pmol/L y las edades <4 y  $\geq$  4 años.

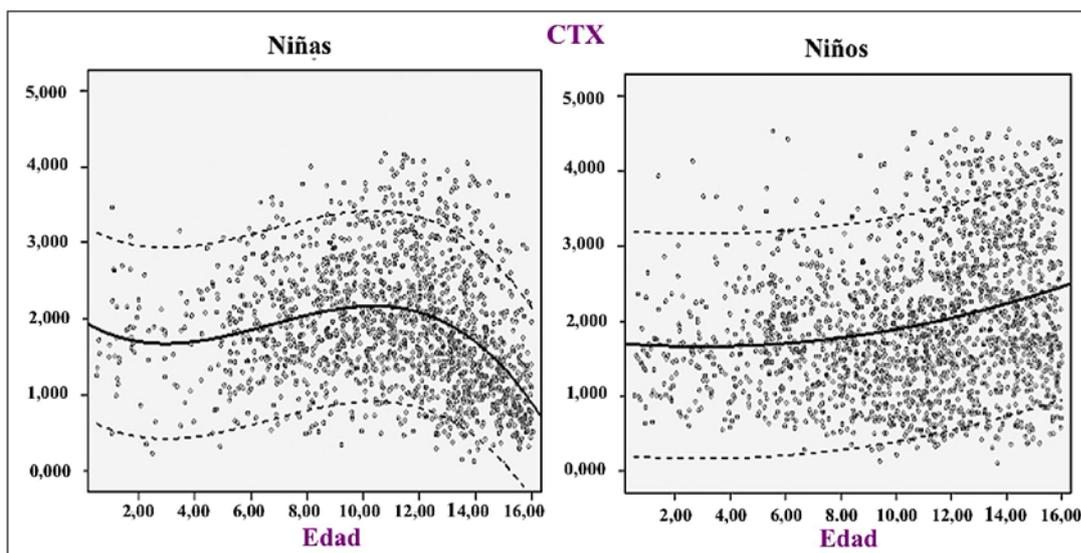
*Adaptado de Buzi F, et al. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factors  $\kappa$ B (RANKL) concentrations in normal children and in children with pubertal precocity, Turner's syndrome and rheumatoid arthritis. Clin Endocrinol (Oxf). 2004 Jan;60(1):87-91.*

OPG es secretada por las células osteoblásticas y se expresa en una amplia variedad de células y tipos de tejidos. Actúa como un receptor señuelo soluble que evita la unión de RANKL a RANK, OPG inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos, y estimula la apoptosis de los osteoclastos. Numerosas citoquinas y hormonas (TGF- $\beta$ , PTH, vitamina D, glucocorticoides y estrógenos) ejercen sus efectos sobre la osteoclastogénesis regulando la producción de OPG (184).

$\beta$ -CrossLap o CTX-1 es un marcador de resorción ósea muy estudiado. Los péptidos de colágeno tipo I están presentes en la forma madura del colágeno.

En el proceso de degradación ósea, el telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX) se libera a la circulación (185). La pubertad es un momento de grandes aumentos en la masa ósea durante un período relativamente breve.

El estudio anteriormente mencionado de Gennai I. et al (178), también se realizaron determinaciones de CTX-1 además de FAO. Las concentraciones más altas de CTX-1 se pueden encontrar en el estadio III para las niñas y antes en niños, en el estadio II y III. Se observan diferencias significativas entre el estadio I y los otros estadios de Tanner en ambos sexos ( $p < 0,001$ ). Las concentraciones más bajas se pudieron observar para el estadio I en niños y para el estadio V en niñas. Se pudo observar un aumento significativo tanto para CTX-1 en ambos sexos en Tanner II y III, con una disminución en el estadio IV en niñas (Figura 14).



**Figura 14. Diagrama de puntos con curvas de referencia para las concentraciones de CTX-1 en función de la edad y el sexo.**

*Las curvas representan el percentil 50 (líneas rectas) y el percentil 10 y 90 (líneas punteadas).*

*Adaptado de Gennai I, et al. Age- and sex-matched reference curves for serum collagen type I C-telopeptides and bone alkaline phosphatase in children and adolescents: An alternative multivariate statistical analysis approach. Clin Biochem. 2016 Jul;49(10-11):802–7.*

Otros marcadores de resorción ósea, como la PTH y 1,25 OH vitamina D fueron estudiados por Deboer MD. et al. (186). Los datos mostraron un aumento compensatorio en los niveles de PTH en respuesta a la captación de calcio durante los períodos de acumulación ósea máxima, lo que aumenta la producción de 1,25

OH vitamina D para promover la absorción de calcio. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que examina las asociaciones entre la PTH y los niveles 1,25 OH vitamina D y la acumulación ósea. Estos datos tienen implicaciones para la interpretación de las elevaciones leves de los niveles de PTH durante la pubertad y para los estudios de los requerimientos de calcio durante el crecimiento (186).

Y es conocido que la vitamina D o 25 OH vitamina D, es un factor dietético esencial necesario para la mineralización normal del tejido osteoide. La suplementación con vitamina D, incluso cuando se administra durante la infancia, se ha asociado con un aumento de la DMO en niños prepúberes (187).

Las citoquinas proinflamatorias como las IL-6 y el TNF- $\alpha$ , pueden afectar al crecimiento de los niños afectados de enfermedades crónicas, como la FQ, actuando sobre el cartílago de crecimiento y también a la ingestión de nutrientes, por su poder anorexígeno.

## 1.4 DENSITOMETRÍA ÓSEA

### 1.4.1 ESTUDIO CON DEXA. BASES FÍSICAS

#### ***Características técnicas del examen***

#### ***Densitometría radiológica de doble energía (Hologic QDR Explorer series Bone Densitometer)***

La densitometría radiológica de doble energía es el método que ha alcanzado mayor difusión para cuantificar la masa ósea. Se han utilizado diversas siglas para su denominación derivadas de la sinonimia empleada en la literatura y por los fabricantes: Dual X-ray absorptiometry (DXA), dual energy X-ray absorptiometry (DEXA), Quantitative digital radiology (QDR).

**Principio de funcionamiento:**

Los diferentes densitómetros DEXA existentes se basan en el mismo principio: generación de una imagen digitalizada en función de la atenuación de dos haces colimados de rayos X de alta y baja energía: uno es absorbido por las partes blandas y el otro por el hueso. Detecta la absorción de cada uno de ellos al atravesar al paciente. Aunque existen diferencias en tipo de filtros, número de detectores y emisores de rayos X, sistema de calibración y algoritmos para la selección de áreas de interés, son estos dos últimos los responsables de que no sean absolutamente equiparables los valores obtenidos por los diferentes densitómetros.

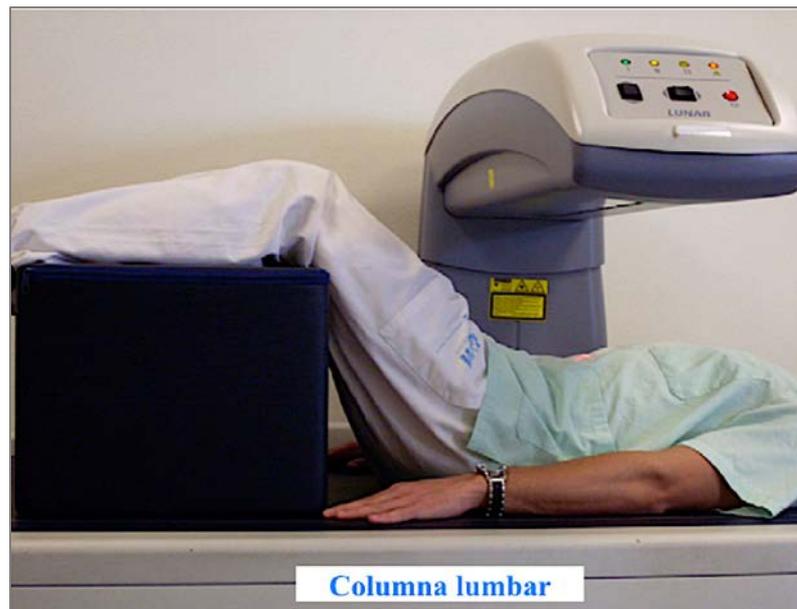
El proceso matemático mediante el cual se calcula la DMO, se inicia con la diferenciación del tejido óseo respecto al blando (diferencial de la captación del haz de baja y alta energía), determinación del área explorada ( $\text{cm}^2$ ), determinación del CMO (g) y con el cociente de ambos se obtiene la densidad por unidad de superficie (DMO,  $\text{g}/\text{cm}^2$ ).

El densitómetro consta de: a) *Unidad de exploración*, integrada por tubo de rayos X, un sistema de detección de radiaciones gamma (que se desplazan sincronizadamente a lo largo de la superficie de exploración donde se sitúa el paciente), un ordenador encargado de gobernar el sistema, producir la digitalización y análisis de imagen y, finalmente aportar los datos densitométricos; b) *Consola de control* provista de monitor de visualización de imágenes, teclado de control del ordenador con videoimpresora y un sistema de conservación de datos.

El sistema de rayos X está formado por un tubo emisor que emite de forma pulsátil 2 haces de 100 y 140Kev colimados. El sistema de generación de imagen se basa en una escala digital proporcional al contaje de radiación efectuado por los cristales de  $\text{CdWO}_4$  (*CWO: tungtato de cadmio, cristal transparente que emite luz cuando es alcanzado por rayos gamma y rayos X, haciéndolo útil como detector de radiación ionizante*) que posteriormente se refleja en pantalla en una escala de blanco-grises.

## Introducción

El procedimiento operativo se inicia con la colocación del paciente en decúbito supino sobre la unidad de exploración, desprovisto de cualquier objeto metálico sobre las áreas a explorar. En el caso de la exploración de la columna lumbar se corrige la lordosis de la misma mediante la elevación de los miembros inferiores (caderas y rodillas flexionadas) sobre un soporte de goma espuma, con una angulación de  $45^{\circ}$  del fémur respecto al plano de exploración (Figura 15) (188).



**Figura 15. Posición del paciente: columna lumbar.**

*Adaptada de Lorente RM, et al. Absorciometría con rayos X de doble energía. Fundamentos, metodología y aplicaciones clínicas. Radiología. 2012;54(5):410-423.*

Una vez colocado el paciente, se sitúa el eje fuente-detector en la perpendicular a la 5ª vértebra lumbar (unos 2-3 cm debajo del ombligo) con la ayuda de un localizador provisto de una emisión láser. Se determina el campo de exploración de unos 15–20 cm de largo y 10-15 cm de ancho, en función del tamaño del paciente, y se efectúa un barrido en líneas (0.5 líneas/mm) con una resolución de 1mm y velocidad de barrido de menos de 21mm/s (tabla 6).

**Tabla 6. Características de “Hologic Explorer QDR series Bone Densitometer”.**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>HOLOGIC EXPLORER QDR</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>Fuente</b>	4ª generación, sistema multidetectores consistente en cristales de CdW04 acoplados a diodos de silicio. (Fan beam o haz de abanico)	Mejora la precisión, rapidez y la calidad de la imagen
<b>Detectores</b>	64	
<b>Control de calidad</b>	2 minutos con representación gráfica de resultados	Permite al operador evaluar la precisión y la estabilidad del equipo.
<b>Cilindro de calibración</b>	Calibración continua, interna y automática	HOLOGIC usa un sistema de calibración interna mediante la comparación de los valores conocidos del estándar con los desconocidos del paciente.
<b>Precisión in vivo:</b>		
<b>Columna</b>	0.76%	
<b>Cadera</b>	0.91%	
<b>Antebrazo</b>	1%	
<b>Cuerpo completo</b>	1%	
<b>Columna lateral</b>	1%	
<b>Tiempo de scan-exposición:</b>		
<b>Columna</b>	90s - 0,07 mGy	
<b>Cadera</b>	90s - 0,07 mGy	
<b>Antebrazo</b>	30s - 0,05 mGy	
<b>Cuerpo completo</b>	403s - 0,012 mGy	
<b>Area útil</b>	195cm x65cm	
<b>Energías Rx</b>	140/100	Permite mejor diferenciación entre tejido óseo y tejidos blandos
<b>Enfriamiento tubo</b>	No precisa	
<b>Imagen</b>	Dual y mono energías	Puede elegirse que forma de mostrar la imagen se prefiere.

En la actualidad, existen otras técnicas no invasivos para evaluar la masa ósea en diferentes áreas esqueléticas. Cada una es más sensible que la radiografía

convencional para detectar déficits en el mineral óseo. Los métodos varían en costo, velocidad de medición, exposición a la radiación ionizante y regiones del esqueleto que se pueden escanear. Entre éstas técnicas se encuentran, los sistemas de ultrasonidos cuantitativos (QUS), la tomografía computarizada tridimensional (QCT, por sus siglas en inglés, Quantitative Computerized Tridimensional Tomography) y la resonancia magnética (MRI, siglas en inglés Magnetic Resonance Imaging). Los parámetros que mide QUS son la atenuación de la amplitud de onda o BUA (Broadband Ultrasound Attenuation) a través del hueso y la velocidad de transmisión o SOS (Speed of Sound) a través del hueso. Sin embargo, la técnica es menos precisa que el DEXA, sólo puede usarse en el esqueleto periférico y existen menos datos de referencia pediátricos que para el DEXA (189,190). La tomografía computarizada cuantitativa mide la densidad ósea volumétrica, distingue entre hueso cortical y trabecular, y puede utilizarse para evaluar el esqueleto central y periférico (191,192). No obstante, el QCT generalmente está menos disponible para uso clínico, cuesta más, requiere una exposición a la radiación aproximadamente 10 veces mayor que la de DXA y las bases de referencia pediátricas también son más limitadas que para DXA (192). La resonancia magnética es capaz de examinar tanto la geometría de la estructura ósea como la masa ósea en niños. Y al igual que con la QCT, la técnica es más costosa y hay una falta de datos normalizados (193).

Por todo esto, ha sido la DEXA (prueba empleada en esta tesis) la técnica de referencia para el estudio de la masa ósea en la actualidad. El interés en la utilidad clínica de la DMO basada en DXA se ha incrementado en los niños en los últimos años, debido a que un número creciente de estudios pediátricos ha mostrado una relación clara entre la baja DMO y el riesgo de fracturas vertebrales (194–196) y no vertebrales (197). Es el método preferido para las mediciones clínicas de la densidad ósea en niños debido a su disponibilidad, reproducibilidad, velocidad, baja exposición a la radiación ionizante y datos robustos de referencia pediátrica (198).

## 1.4.2 PARÁMETROS, VALORES DE REFERENCIA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### **Parámetros de medida de la masa ósea**

- **BMM** (Bone mineral mass) o **BMC** (Bone mineral content): Cantidad de hueso mineralizado (CMO) expresado en gramos.
- **BMA** (Bone mineral area mass): Cantidad de hueso mineralizado por unidad de área expresado en g/cm<sup>2</sup> (en la práctica se utilizan las siglas DMO (Densidad mineral ósea) o BMD (Bone mineral density) para expresar la BMA, también llamada densidad mineral ósea aparente.
- **BMD** (Bone mineral density): Cantidad de hueso mineralizado por unidad de volumen expresado en g/cm<sup>3</sup> (sólo es capaz de medirlo la Tomografía computerizada cualitativa o QCT).

### **Valores de referencia**

Además de medir la masa ósea de un determinado individuo en términos absolutos permite la comparación de ésta con valores de referencia poblacionales. El equipo dispone de una extensa base de datos en línea de valores de referencia incluidos con Explorer que simplifica la interpretación de los estudios. Incluye datos de referencia que coinciden con las características étnicas que permiten la personalización de los valores de referencia del usuario a la población local de pacientes. Los datos de referencia de cadera se basan en NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), de acuerdo con los criterios de estandarización. Y también posee base de referencia pediátrica.

Permite la realización y aplicación de base de datos propia.

En el informe se presentan además de los datos biográficos del paciente, el coeficiente de variación, los datos del área, contenido mineral óseo (gramos) y de densidad ósea (g/cm<sup>2</sup>), la representación gráfica de su comparación con pico de

masa ósea de adultos jóvenes (T-score) y comparación con personas sanas de su misma edad y sexo (Z-score).

### **Interpretación de resultados**

La DMO es un parámetro biológico que sigue una distribución continua en el que resulta difícil establecer un punto de corte a partir del cual pueda hablarse de una situación anómala o patológica y que permita predecir la aparición de fracturas osteoporóticas y por tanto un umbral de tratamiento.

### **Escala T (T-score)**

La comparación se establece entre la masa ósea (MO) individual y la MO de adultos jóvenes (20-35 años) y sanos del mismo sexo. Esta puntuación se expresa en forma de porcentaje y de número de desviaciones estándar (DE) en que ese valor se separa de la media de la MO de los valores de referencia. Se obtiene a partir de la MO del paciente menos el valor medio de la MO en los adultos jóvenes dividido por la DE de la MO ( $DE_{MO}$ ) de los adultos jóvenes del mismo sexo (199,200). El objetivo del T-score para adultos no es proporcionar una comparación con la edad, sino estimar la pérdida de hueso en relación con la densidad máxima (201,202).

$$T\text{-score} = \frac{MO \text{ Paciente} - \text{Valor medio MO adultos jóvenes}}{DE_{MO} \text{ de adultos jóvenes del mismo sexo}}$$

### **Escala Z (Z-score)**

La comparación se establece entre la MO individual y la MO de individuos de la misma edad y sexo. Esta puntuación se expresa en forma de porcentaje y de número de DE en que ese valor se separa de la media de la MO de los valores de referencia. Se obtiene a partir de la MO del paciente menos el valor medio de la MO de individuos de la misma edad y sexo dividido por la DE de la MO de la población sana de la misma edad y sexo (199,200,203).

$$Z\text{-score} = \frac{MO \text{ Paciente} - \text{Valor medio MO población misma edad y sexo}}{DE_{MO} \text{ de la población sana de la misma edad y sexo}}$$

Varios estudios prospectivos y metaanálisis muestran que existe un incremento global del riesgo de fractura por cada descenso en una DE en la normalidad de la medición de DMO, estimado entre el 50 y 150% según el lugar de medición. Sin embargo, otros factores de riesgo pueden aumentar el riesgo en magnitudes similares o superiores, siendo necesario evaluarlos en todos los casos (204–207).

### 1.4.3 OSTEOPOROSIS

#### **Definición**

La osteoporosis generalmente se ha considerado una enfermedad adulta, pero cada vez hay más pruebas de que sus raíces se encuentran en la infancia. La osteoporosis, que es sintomática durante la infancia, está emergiendo como un problema recientemente reconocido entre poblaciones específicas en riesgo. Por lo tanto, cada vez es más evidente que los factores infantiles, como la dieta, el estilo de vida, las enfermedades crónicas y los medicamentos, pueden tener un impacto importante a corto plazo en la salud ósea y un efecto sostenido en el logro de la masa ósea máxima, con el potencial para la morbilidad a largo plazo en la edad adulta (207).

Clásicamente, la osteoporosis se ha definido como una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro microarquitectónico del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a las fracturas (208). La definición propiciada por la OMS en 1994 considera que se padece osteoporosis densitométrica cuando la medida de la densidad mineral ósea es igual o está por debajo de  $-2,5$  desviaciones estándares (T-score  $\leq -2,5$  DE) respecto de la media de DMO durante el pico de masa ósea, y que existe osteoporosis establecida cuando, además de reunir el criterio anterior, ya se ha producido la fractura por fragilidad (209). Se habla de osteopenia cuando el valor de DMO se encuentra entre  $-1,0$  y  $-2,4$  desviaciones estándares. Dicha medida se establece con la determinación de la densidad ósea después de realizar una

densitometría en columna lumbar y en cuello femoral, respecto a la desviación estándar de las efectuadas durante el pico máximo de DMO.

La definición de la OMS ha quedado superada, ya que sólo hacía referencia a la DMO obtenida en una densitometría, un marcador de cantidad de hueso, pero insuficiente para medir calidad ósea, definiéndola como “enfermedad esquelética, caracterizada por una disminución de la resistencia ósea que predispone al paciente a un mayor riesgo de fractura” y donde la calidad ósea cobra su relevancia. Cada vez cobra más importancia la estructura ósea (tanto micro como macroscópica), la fisiología (es decir, el remodelado óseo) y los microtraumatismos a los que se expone el hueso, en contraposición a la masa ósea, factor primordial pero no único en la producción de un hueso frágil.

Según las directrices de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) en 2013, el diagnóstico de osteoporosis en niños y adolescentes no debería basarse únicamente en el valor de la DMO. El término “osteopenia” no debería aparecer en un informe, al igual que el término “osteoporosis” sin un historial significativo de fracturas ( $\geq 2$  para la edad de 10 años o  $\geq 3$  para la edad de 19 años). “Baja masa ósea o densidad mineral ósea” es el término recomendado en pediatría para informar valores de Z scores  $< -2$  DE (210).

Para los adultos, las evaluaciones clínicas del estado óseo se basan en la DMO, definida como la relación entre el contenido mineral óseo y la imagen bidimensional proyectada del área ósea. El tamaño y la geometría del esqueleto adulto permanece relativamente estable durante muchos años; por lo tanto, el área ósea permanece relativamente constante para el individuo. DMO tiene una varianza menor que CMO; por lo tanto, ha evolucionado como el parámetro óseo para evaluar las condiciones anormales. Este enfoque en la normalización de CMO es inadecuado para su uso en niños, porque tanto CMO como el área ósea están cambiando durante el crecimiento (211). Sin embargo, la capacidad de obtener escaneos mediante DXA

en niños en pocos minutos con buena precisión (212,213) ha contribuido a su creciente uso clínico en pediatría. Para la medición de la columna vertebral, generalmente se proporciona un Z Score coincidente con la edad.

### **Umbrales diagnósticos**

Existen diferentes puntos de vista sobre la delimitación de niveles de normalidad de la medición de DMO, dado que el proceso de deterioro del tejido óseo y la historia natural de la enfermedad se desarrollan de forma paulatina, sin hacerse clínicamente manifiesta hasta las fases finales. Por una parte, algunos autores consideran que la pérdida de masa ósea es parte del proceso normal de envejecimiento y que sólo puede considerarse patológica en casos muy específicos (214). Por otro lado, la opinión generalizada es que la pérdida de masa ósea con la edad puede evitarse y que los valores deberían mantenerse lo más próximos posible a los máximos alcanzados entre los 20-30 años (154).

Este es el criterio seguido en la actualidad por la mayoría de autores y organizaciones, siguiendo la definición del informe de la OMS antes comentado. Osteopenia y osteoporosis se definen comparando la densidad ósea de un individuo con la media de una población de referencia de mujeres jóvenes sanas y de raza blanca, mediante la puntuación T (número de desviaciones estándar en que se diferencia de la media), según los valores expresados en la siguiente (tabla 7).

**Tabla 7. Definiciones de la OMS de Osteoporosis y Osteopenia.**

Clasificación	Valor de la densidad ósea en relación a la media de una población de referencia de adultos jóvenes
<b>Normal</b>	T-score $\geq$ -1 DE
<b>Osteopenia</b>	T-score $< -1, > -2.5$ DE
<b>Osteoporosis</b>	T-score $\leq -2.5$ DE
<b>Osteoporosis clínica o establecida</b>	T-score $\leq -2.5$ DE + fractura no traumática

La Organización Mundial de la Salud define la osteoporosis en adultos mayores sobre la base de baja DMO en relación con las normas para adultos jóvenes sanos (209). Esta definición no debe aplicarse a niños y adolescentes porque aún no han llegado al pico de masa ósea y porque no se ha establecido un "umbral de fractura" para la DMO en pacientes más jóvenes. Esto refleja el hecho de que la puntuación en DE de la DMO para la edad (puntuación Z) varían dependiendo de los datos normalizados pediátricos (215). Además, las fracturas por fragilidad pueden ocurrir a pesar de los valores de DMO dentro del rango normal para la edad (216).

La definición de osteoporosis pediátrica según la ISCD, incluye un umbral de DMO de  $\leq -2$  DE junto con un historial de fracturas clínicamente significativo. La excepción a esto es la presencia de una fractura vertebral de bajo trauma, en cuyo caso los criterios de umbral de DMO no se aplican (210). La elección de la base de datos de referencia debe hacerse en función del tamaño muestral, sexo, edad, etnia de la población de referencia, así como el lugar de medición.

En un estudio realizado por Gafni R et al. (217) se aborda el sobrediagnóstico de osteoporosis en niños por una mala interpretación del DEXA. Se exponen como errores de diagnóstico de osteoporosis los siguientes: 1) El más frecuente, el uso de T-score en lugar del Z-score. 2) Niños inusualmente grandes o pequeños para

su edad donde los datos normalizados por edad pueden no ser apropiados. La DMO regional medida por DEXA puede ser anormalmente baja en un niño con estatura baja simplemente porque los huesos son más pequeños, a pesar de que la DMO volumétrica es normal. En esta situación, la baja DMO del área puede ser artefactual, y sus consecuencias clínicas no están claras (218). De manera similar, la pubertad retrasada puede llevar a una aparente baja DMO porque los esteroides sexuales aumentan el tamaño del esqueleto y, por consiguiente, la DMO del área. Sin embargo, los esteroides sexuales también tienen un efecto directo en el recambio óseo, aumentando la DMO volumétrica de algunos huesos (219,220). Por lo tanto, la pubertad tardía podría considerarse una causa de DMO volumétrica leve, reversible (221) disminuida. Se han propuesto varios métodos para corregir la variabilidad en el tamaño del hueso y el inicio de la pubertad, incluida la interpretación de DEXA para la edad ósea, la edad de talla o la etapa puberal (218,222); utilizando modelos matemáticos para estimar la DMO volumétrica. La utilidad de estos métodos para la atención clínica sigue siendo controvertida. 3) El uso de bases de datos de referencia pediátricas que no diferencian entre niños y niñas. La DMO normal de niños y niñas difiere, sobre todo en la pubertad temprana. 4) Otro error de interpretación es el resultado de un mapa óseo inexacto.

Según la guía europea de mineralización ósea en fibrosis quística (31), la DXA, es actualmente el método estándar para medir el CMO y la DMO en personas con FQ. La columna lumbar se muestra como lugar de medición para la DMO en pacientes menores de 20 años.

#### 1.4.4 RELACIÓN DENSIDAD ÓSEA Y FRACTURAS

##### ***Evaluación global del riesgo de osteoporosis y fractura***

En los últimos años, se ha progresado mucho en la comprensión del papel de la baja densidad mineral ósea en la génesis de la fractura osteoporótica. Sabemos que las fracturas pueden aparecer en sujetos sin criterios densitométricos de

osteoporosis y, a la inversa, muchos pacientes con criterios densitométricos de osteoporosis no sufren fracturas. El diagnóstico y el tratamiento de la osteoporosis debe establecerse a partir de una valoración integral del riesgo de fractura y no sobre la medida aislada de la DMO (223–226).

Algunos de los principales determinantes del riesgo de fracturas se muestran en la tabla 8:

**Tabla 8. Factores de riesgo de fractura.**

	<b>RIESGO ALTO (R. relativo &gt; 2)</b>	<b>RIESGO MODERADO (R. relativo 1 a 2)</b>
<b>Parcial o totalmente independientes de DMO</b>	Edad Antecedentes personales de fracturas osteoporóticas. Antecedente familiar de fractura de fémur Bajo peso corporal (IMC < 20) Glucocorticoides (≥ 3 meses con ≥ 7,5 mg/día de prednisona) Recambio óseo elevado (MRO)	Diabetes Tabaquismo Incapacidad para levantarse de una silla Ingesta elevada de alcohol (≥ 3 medidas al día) Hipertiroidismo
<b>Dependientes de DMO</b>	Hipogonadismo en el varón Hiperparatiroidismo 1º Anorexia nerviosa Inmovilización prolongada Síndrome de malabsorción	Sexo femenino Menopausia precoz (< 45 años) Amenorrea 1ª y 2ª Artritis reumatoide Déficit de vitamina D Ingesta baja de Calcio (< 500-850 mg/día)

*Adaptado del Comité de la SEIOMM (Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral). Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Rev Osteoporos Metab Miner. 2009;1(1).*

El factor más predictivo del desarrollo de fracturas es la determinación de la DMO (223,224,227), no obstante estos factores de riesgo mencionados anteriormente (tabla 8), como la edad, los antecedentes personales o familiares de fractura, son de gran importancia en predicción del riesgo de fractura (223,227,228).

La OMS desarrolló un algoritmo de predicción de riesgo de fractura absoluto a 10 años (FRAX®). Éste se encuentra disponible desde 2008 y está basado en factores de riesgo predictivos y ajustado por la tasa de fracturas osteoporóticas de diferentes países, entre ellos el nuestro. Además ese cálculo también puede hacerse sin conocer el valor de DMO y con una simple serie de datos clínicos. Y más reciente, profesores de estadística de la Universidad de Nottingham publicaron otro modelo de cálculo de riesgo absoluto de fractura a 5 o 10 años (QFracture™) desarrollado y testado en el ámbito de la atención primaria de Inglaterra y Gales (229). Incluye un mayor número de antecedentes médicos y no usa la DMO. Aunque dichos modelos no están exentos de críticas por su imprecisión en algunas poblaciones, supone un avance a la hora de dar un valor absoluto que es mucho más informativo para los pacientes y para médicos no expertos en osteoporosis que conceptos como el T Score, el gradiente de riesgo o el riesgo relativo. También permiten estas fórmulas el cálculo de los umbrales en los que determinadas intervenciones diagnósticas (solicitar una densitometría, terapéuticas, iniciar un determinado tratamiento) resultan coste-efectivas.

## 1.5 DENSIDAD MINERAL ÓSEA Y CANTIDAD MINERAL ÓSEA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

### 1.5.1 CRECIMIENTO Y MINERALIZACIÓN

La mineralización ósea muestra una tendencia al incremento progresivo desde el nacimiento a la edad adulta. En este proceso es cuando hay un mayor aporte de sales minerales a nivel óseo (230,231). Los niveles de calcio y fósforo serán determinantes críticos en el proceso de mineralización ósea (232). Sin embargo, el incremento de la mineralización es mucho más rápido, entre los 0 y los 3 años de vida, y prosigue después a menor ritmo y de forma prácticamente superponible en ambos sexos, hasta aproximadamente los 10 años, en los que claramente tienen mayor DMO las niñas. Estudios longitudinales en ellas demuestran que la DMO

tiene un incremento importante, tanto a nivel lumbar como femoral, de los 11 a los 14 años, para enlentecerse hacia los 16 y prácticamente cesar 2 años más tarde. En los niños, el periodo de máxima mineralización es más tardío, intenso y prolongado (13-17 años), se enlentece entre los 17 y los 20 años a nivel lumbar y medio femoral, y no varía en este último periodo de la DMO del cuello femoral. Al llegar al estadio puberal V, cuando el crecimiento es inferior a 1cm/año, todavía hay ganancias en la DMO de los chicos, pero no de las chicas. Por lo tanto, hay una importante diferencia sexual en los periodos de obtención del pico de masa ósea (233,234).

Existen, pues, 2 periodos que podríamos considerar críticos en la obtención del pico de masa ósea: los 3 primeros años de vida y la pubertad. Es muy probable que los defectos en la mineralización surgidos durante el primero puedan ser compensados más adelante. Sin embargo, es posible que las interferencias que se presentan durante la pubertad condicionen ya un riesgo real de osteoporosis, difícil de compensar.

### 1.5.2 VALORES DE NORMALIDAD DE DMO EN NIÑOS

En la literatura podemos encontrar varios estudios dedicados a describir la DMO en la población infantil española. En Sevilla se realizó un estudio por Moreno et al. (235) donde se analizó la DMO en 282 niños sanos (142 niños y 140 niñas) de entre 2 y 14 años de edad. De igual manera, en Cataluña se llevó a cabo otro estudio por Del Río et al. (236) en 471 niños (de 3 meses a 21 años), 256 niños y 215 niñas, y en Madrid se han realizado dos trabajos, uno por Marco et al. (237) con 351 niños (de 6 meses a 20 años), 184 niños y 167 niñas, y otro por Armada et al. (238) con 246 niños (2-20 años).

Del Río et al. (236) observaron en su estudio que tanto la CMO como la DMO aumentan progresivamente desde la infancia hasta la edad adulta, y que los valores medios fueron similares en ambos sexos hasta la edad de 9-10 años, del mismo

modo que ocurrió con la talla. Posteriormente y debido al crecimiento más rápido que presentan las niñas (debido al desarrollo puberal más adelantado), los valores de DMO fueron superiores en las niñas que en los niños hasta la edad de 14-15 años. Además, los valores de DMO continúan aumentando en ambos sexos, incluso después de alcanzar la estatura adulta: 15-16 años en las niñas y 17-18 años en los niños hasta los 21 años. También se vio que los valores de DMO en adultos eran mayores en niños que en niñas, como ocurre con la altura, existiendo además, una correlación positiva y estadísticamente significativa en ambos sexos entre los valores de DMO, edad, talla y peso. Estos autores vieron que el incremento anual de los valores de DMO fue más elevado durante los tres primeros años de vida y disminuyó posteriormente hasta la pubertad, al igual de lo que aconteció con la velocidad de crecimiento de la talla. Durante la pubertad también hubo incremento de los valores de DMO (alcanzándose su máxima expresión en la pubertad tardía) y con los estadios IV de Tanner, para continuar posteriormente con menor intensidad durante la vida adulta.

El estudio determinó que los valores de CMO se correlacionaban más con la altura que las cifras de DMO, y que los valores de la DMO reflejaban mucho mejor la mineralización de la matriz ósea que los de CMO.

En el estudio realizado por Marco et al. (237) no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en las medias de DMO dentro de cada sexo por grupo de edad y el inmediatamente superior. Las niñas presentaron unos valores más altos de DMO en los grupos de edad de 12-13 y 14-15 años respecto a los niños. La variable sexo se objetivó que no interacciona con la edad. La CMO en ambos sexos por grupos de edad tampoco se demostró con diferencias estadísticamente significativas. En este trabajo, se obtuvieron rectas de regresión de DMO y CMO frente a edad para ambos sexos paralelas y con igual punto de corte, es decir, coincidentes.

En el estudio sevillano de Moreno et al. (235) se determinó la relación de la densidad ósea con la edad, peso y talla, siendo el peso el parámetro que más influía en la DMO. Estos autores apreciaron diferencias significativas en las medias de densidad ósea por sexos; con incremento de dicha variable con la edad en ambos sexos y, sin diferencias significativas entre los dos y los diez años. Desde esta edad y hasta los 14 años, la densidad ósea se vio más alta en las niñas.

En el estudio de Del Río et al. (236) la DMO registrada en la población de estudio fue mayor que en la muestra de Marco et al. (237), excepto en los niños de entre 10 y 11 años y las niñas entre 16 y 17 años. En el trabajo catalán, los niños entre 4 y 14 años obtuvieron una puntuación de 2-1,5 DE por encima del trabajo madrileño. Las niñas del grupo catalán alcanzan casi 1 DE más sobre la madrileña a los 13 y 14 años, y algo menos a los 15. El estudio sevillano de Moreno et al. (235), se observaron valores de Z positivos en los niños hasta los 4 años (incluso + 2 DE a los 4 años) y negativos de 5 a 10 años, respecto al estudio madrileño de Marco et al. (237) (alcanzando - 1,5 DE a los 10 años). Las niñas presentan unos valores de Z positivos respecto al realizado en la comunidad de Madrid hasta los dos años y negativos respecto a este último de dos a once años, excepto a los 11 donde fue positivo. En el trabajo de Armada et al. (238) se observaron unos valores de Z negativos desde los 4 a los 13 años, 0,5 DE a los 14 y -1 DE a los 16; en las niñas el valor de Z fue negativo en todas las edades, excepto a los 10 años que fue prácticamente cero DE, y -3 DE a los 16 años, respecto a la población de Moreno et al. (235).

Podemos resumir de todo esto, que la densidad ósea en la población infantil española parece presentar variación a nivel geográfico entre las distintas poblaciones analizadas, hallándose en la comunidad catalana las cifras más altas.

### 1.5.3 FRACTURAS ÓSEAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

A diferencia de la pérdida ósea observada en mujeres posmenopáusicas, la pérdida ósea en la población con FQ comienza a una edad temprana y continúa con el envejecimiento. La enfermedad ósea relacionada con la FQ se caracteriza por la disminución de la DMO y el aumento de las tasas de fracturas de bajo trauma (239).

Estudios longitudinales en pacientes con FQ han demostrado una acumulación subóptima de masa ósea en niños y adolescentes (240), y pérdida prematura en adolescentes y adultos jóvenes (241).

Un metaanálisis de Paccou y col. informó de una prevalencia combinada de fracturas vertebrales y no vertebrales del 14% (IC 95%, 7.8-21.7) y 19.7% (IC 95%, 6.0-38.8), respectivamente (242). La mayor morbilidad de las fracturas de costillas y vertebrales en FQ resulta del dolor relacionado con la tos, el aclaramiento ineficaz del esputo y la exacerbación pulmonar. Otra consecuencia importante de la fractura de bajo trauma es que es una contraindicación relativa para el trasplante de pulmón en algunos centros.





# JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

---

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

De la revisión realizada de la literatura se comprueba que el aumento de la supervivencia en los pacientes con FQ en las últimas décadas precisa de nuevas líneas de investigación sobre áreas subestimadas hasta el momento. La enfermedad ósea relacionada con la fibrosis quística (CFBD) por sus siglas en inglés, *Cystic Fibrosis Bone Disease*, es el resultado de un aumento de la longevidad en estos pacientes durante las últimas décadas. Aunque ha habido una clara mejoría de la esperanza de vida, este aumento ha traído comorbilidades asociadas que pueden afectar a la calidad de vida de los pacientes.

La salud ósea de niños y adolescentes se ha convertido en una preocupación médica cada vez más importante. Existe un creciente reconocimiento de que la baja masa ósea y las fracturas pueden complicar varios trastornos crónicos genéticos y adquiridos de la infancia. Las fracturas también son comunes en los jóvenes sanos; la incidencia máxima ocurre durante el crecimiento peripuberal (243). El aumento documentado del 35% al 65% de las fracturas infantiles comunes en las últimas 4 décadas ha generado preocupación de que los estilos de vida actuales comprometan la salud ósea temprana (244). Por este motivo, los estudios que implican a los niños en edad temprana podrían revelar los orígenes de la CFBD y con ello cambiar la práctica clínica.

Es necesario por tanto, disponer de estrategias que permitan la prevención, la detección temprana y el tratamiento de la enfermedad ósea.

## 2.2 HIPÓTESIS

1. La DMO está disminuida en pacientes con FQ, existiendo una relación directa entre los distintos parámetros de evaluación de la DMO de columna lumbar, y con respecto a la edad y parámetros antropométricos (peso, talla e IMC) y marcadores.
2. Los niveles séricos de marcadores de formación ósea están disminuidos en los pacientes FQ frente a los controles, y existe una elevación de marcadores de resorción ósea en pacientes frente al grupo control.

## 2.3 OBJETIVOS

1. Analizar la frecuencia de la alteración ósea en pacientes con FQ.
2. Valorar la alteración de la medición de la DMO en función de las variables clínicas.
3. Evaluar las diferencias de biomarcadores inflamatorios y de remodelado óseo entre pacientes con FQ y sin FQ (controles) y valorar la contribución de los marcadores en la ocurrencia de CFBD en los pacientes FQ.





# MÉTODOS



## 3. MÉTODO

---

### 3.1 DISEÑO Y DESARROLLO DEL ESTUDIO

La presente tesis doctoral se trata de un estudio observacional, prospectivo, de casos y controles donde se analiza la densidad mineral ósea y los marcadores de remodelado óseo en niños con FQ (casos) y niños sin FQ (controles). El presente estudio es el resultado de una iniciativa de investigación colaborativa entre la Unidad de Metabolopatías y la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

#### ***Población a estudiar***

Se seleccionaron a los pacientes diagnosticados de FQ como casos y a sujetos sin FQ como controles. El rango de edad de los pacientes en este estudio ha sido de  $\geq$  6 años hasta los 16 años inclusive, de ambos sexos.

Los casos fueron diagnosticados por un test del sudor positivo (niveles de cloro en sudor  $\geq$ 60 mmol/L), junto con una clínica compatible y detección de 2 mutaciones en gen CFTR.

#### ***Criterios de inclusión de los casos***

1. Pacientes diagnosticados de FQ estables durante al menos 3 meses antes del comienzo del estudio (sin infecciones pulmonares agudas recientes ni toma de esteroides sistémicos).
2. Pacientes con FQ del área de Andalucía Occidental, atendidos en la Unidad de Referencia de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío con residencia en Andalucía.
3. Firma de consentimiento informado por los tutores legales.

***Criterios de exclusión de los casos:***

1. Pacientes  $\leq 6$  años de edad.
2. Poseer algún implante metálico en el organismo que distorsiona los datos obtenidos al realizar la densitometría.
3. Enfermedad o proceso que impida al paciente permanecer inmóvil durante un período breve de tiempo necesario para la realización de la densitometría.
4. Situación clínica como la inmovilización permanente o ingesta mantenida de medicamentos que interfieran en la DMO como los glucocorticoides sistémicos.

Los sujetos sin FQ seleccionados como controles sanos fueron reclutados de los personas atendidos en consultas externas del mismo hospital. Abarcaron el mismo rango de edad que los casos ( $\geq 6$  años hasta 16 años) y siendo de ambos sexos.

Los criterios de inclusión y exclusión para los controles sanos son los siguientes:

***Criterios de inclusión de los controles:***

1. Ausencia de enfermedades que puedan interferir en el metabolismo óseo.
2. Sujetos que no estén tomando glucocorticoides sistémicos.
3. Recibidos en las consultas externas del Hospital Universitario Virgen del Rocío.
4. Firma de consentimiento informado por los tutores legales.

***Criterios de exclusión de los controles:***

1. Pacientes  $\leq 6$  años de edad.

***Tamaño muestral***

El trabajo de selección de pacientes y recogida de muestras se ha llevado a cabo durante el periodo de un año desde la Unidad Clínica de Fibrosis Quística del Hospital Virgen del Rocío. No existe experiencia previa de suficiente consistencia

## Método

que muestren datos previos para permitir una estimación del tamaño muestral necesario para evaluar los cambios en la DMO entre grupos. Por tanto, se ha intentado recoger el máximo número de pacientes posibles durante un año, intentando alcanzar los 50 pacientes y así poder tener potencia estadística.

### *Protocolo de actuación*

Tras la selección de los casos, se informó a los padres o representantes legales de forma individualizada de la naturaleza y propósitos del procedimiento, beneficios, riesgos, alternativas y medios con que cuenta el hospital para su realización. Esta información ha sido tramitada tanto de forma oral como de forma escrita. Una vez aclaradas las dudas, para satisfacción de los derechos del paciente, como instrumento favorecedor del correcto uso de los procedimientos diagnóstico y terapéuticos y, en cumplimiento de la Ley General de Sanidad, los tutores legales firmaron un formulario de consentimiento informado (anexo I) y se les entregó un documento informativo (anexo II).

En el caso del grupo control, se procedió igualmente a informar de forma individualizada de la naturaleza y propósitos del estudio, tras lo cual los tutores legales firmaron un formulario de consentimiento informado (anexo III) y documento informativo (anexo IV).

La información recogida fue la siguiente:

#### a) Variables demográficas

- Edad
- Sexo
- Talla
- Peso
- IMC
- Grado de insuficiencia pancreática en los pacientes con FQ

- FEV<sub>1</sub>: Volumen expiratorio forzado en el primer minuto (para valorar la función pulmonar).
- Genotipo

b) Variables clínicas

- Concentración sérica de marcadores de formación ósea: P1NP, FAT, FAO, OC y OPG en casos y controles.
- Concentración sérica de marcadores de resorción ósea:  $\beta$  CrossLaps, PTH, 25 OH Vitamina D y 1,25 OH Vitamina D en ambos grupos.
- Concentración sérica de biomarcadores de inflamación: TNF- $\alpha$  e IL-6 en casos y controles.
- Concentración sérica de calcio y fósforo en ambos grupos.
- Valor de DMO o cantidad de hueso mineralizado por unidad de área expresado en g/cm<sup>2</sup> en columna lumbar en 47 casos de un total de 68 pacientes recogidos.
- Valor de DMO expresada en desviaciones estándar (Z Score) en columna en los 47 casos.

Las densitometrías fueron solicitadas el mismo día, en aquellos pacientes que acudieron a consulta para revisión en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío cumpliendo criterios de inclusión y cuyos tutores legales dieron su conformidad para la participación del paciente en el estudio, firmando el consentimiento informado. Posteriormente las densitometrías fueron realizadas unos días después atendiendo al sistema de citas establecido en el servicio de Medicina Nuclear de este Hospital. El mismo día que los pacientes con FQ acuden a consulta para revisión se realizó la extracción de sangre para la determinación de los marcadores de remodelado óseo, biomarcadores de inflamación e iones calcio y fósforo, coincidiendo con su analítica de control. Tras la

recogida de la muestra, ésta es enviada al laboratorio de bioquímica del Hospital Universitario Virgen del Rocío, donde se procedió a la determinación de diferentes marcadores. Para aquellos parámetros que no fueron procesados en el momento, una cantidad de muestra fue alicuotada y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

En el caso del grupo control las muestras de sangre fueron extraídas el día que acuden a consulta externas de este hospital viendo que cumplen criterios de inclusión y se obtiene la conformidad por parte de los tutores legales. Se procedió de igual manera que para las muestras recolectadas de los pacientes, salvo que en este grupo no se solicitaron densitometrías

## 3.2 MÉTODOS DE MEDIDA

### 3.2.1 DENSITÓMETRO

Las características referentes al densitómetro usado en esta tesis doctoral se exponen en la tabla 6.

La densitometría se realizó mediante un equipo de absorciometría de doble haz por rayos X (DXA). Existen diferentes modelos de DXA, de los cuales los más recomendados son los densitómetros Hologic, Lunar y Norland. Estudios corroboran la buena correlación entre distintos equipos o densitómetros y, por tanto, puede decirse que miden lo mismo. La existencia de pequeñas diferencias en los valores absolutos, hacía necesaria la estandarización de la DMO, para que todos los valores puedan ser utilizados independientemente del equipo usado.

Hologic Explorer QDR series Bone Densitometer (Hologic, Zaventem, Belgium), ha sido el densitómetro utilizado en este estudio, ya que es el densitómetro disponible en este hospital. Se realizó densitometría de columna lumbar (L1-L4) obteniendo la DMO. Los datos fueron expresados en valores absolutos (gramos de mineral por centímetro cuadrado de hueso) y relativos (Z Score). Z Score es el número de DE

respecto a la media de DMO de personas sanas de su misma edad y sexo. Por definición, Z Score es aplicable a mujeres premenopáusicas, hombres mayores de 50 años y en niños. En el caso de los niños, el término de “baja masa ósea” es más apropiado para definir la osteoporosis según un grupo de expertos de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica. Un Z Score < -2 usando bases de datos pediátricas de controles emparejados por edad describe una baja densidad ósea para la edad cronológica, como terminología más adecuada. Para obtener los valores relativos (Z Score) de la DMO en pacientes menores de 20 años se comparó con los obtenidos en dos estudios nacionales, uno del grupo de Del Río et al (236) y el otro de Marco et al. (237) (tabla 9 y 10). Para ello se convirtieron los datos del sistema HOLOGIC (sistema con el que opera el densitómetro del servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen del Rocío) al sistema LUNAR operativo del densitómetro de la cohorte del grupo de Del Río y de Marco (tabla 11), mediante las siguientes fórmulas de conversión (245):

$$\text{Columna: Valor Hologic} = (0,906 \times \text{Valor Lunar}) - 0,025$$

Una vez obtenida la DMO, se obtiene el Z-score mediante la fórmula:

$$\text{Z-score} = \frac{\text{MO Paciente} - \text{Valor medio MO población misma edad y sexo}}{\text{DE}_{\text{MO}} \text{ de la población sana de la misma edad y sexo}}$$

**Tabla 9. Valores del Sistema Lunar de DMO (g/cm<sup>2</sup>) en columna de niños sanos españoles de entre 6 y 16 años del área metropolitana de Barcelona distribuidas por sexo.**

	<i>VALOR LUNAR DMO</i>	
	NIÑA	NIÑO
<b>EDADES</b>	<b>DMO COLUMNA</b>	<b>DMO COLUMNA</b>
6-7 años	0,670	0,670
7-8 años	0,700	0,700
8-9 años	0,750	0,710
9-10 años	0,785	0,735
10-11 años	0,820	0,750
11-12 años	0,880	0,785
12-13 años	0,970	0,865
13-14 años	1,070	0,960
14-15 años	1,090	1,050
15-16 años	1,111	1,110
16-17 años	1,130	1,150

**Tabla 10. Valores del Sistema Lunar de DMO (g/cm<sup>2</sup>) en columna en niños sanos españoles de entre 6 y 16 años del área metropolitana de Madrid distribuidas por sexo.**

	<i>VALOR LUNAR DMO</i>	
	NIÑA	NIÑO
<b>EDADES</b>	<b>DMO COLUMNA</b>	<b>DMO COLUMNA</b>
6-7 años	0,665	0,625
7-8 años	0,676	0,681
8-9 años	0,711	0,668
9-10 años	0,758	0,724
10-11 años	0,760	0,769
11-12 años	0,818	0,818
12-13 años	0,954	0,844
13-14 años	0,975	0,891
14-15 años	1,014	0,889
15-16 años	1,069	1,008
16-17 años	1,160	1,126

**Tabla 11. Cálculo del Z score respecto a las poblaciones de referencia.**

<b>PACIENTE</b>	<b>Z-score DS COLUMNA (respecto a población de Marco et al.)</b>	<b>Z-score DS COLUMNA (respecto a población de Del Río et al.)</b>
1	(-0,73)	(-1,90)
3	1,37	0,28
4	(-0,76)	(-1,29)
5	(-2,31)	(-3,09)
6	(-0,15)	(-0,66)
7	(-0,05)	(-0,29)
8	(-0,91)	(-0,91)
10	(-0,10)	(-0,40)
11	(-0,51)	(-0,11)
12	(-1,71)	(-1,02)
13	(-0,23)	(-1,02)
17	(-1,35)	(-1,23)
18	(-1,39)	(-1,48)
19	(-0,06)	(-0,36)
22	0,10	(-0,84)
23	(-0,39)	(-1,74)
26	(-0,22)	(-0,33)
29	(-1,41)	(-1,68)
30	0,35	(-0,38)
31	(-3,55)	(-2,72)
32	(-0,68)	(-2,27)
34	(-0,82)	(-0,84)
36	1,00	0,21
37	(-0,37)	(-0,83)
38	0,87	0,10
39	0,23	(-0,25)
40	(-0,82)	(-1,35)
41	0,21	0,13
42	(-1,35)	(-2,14)
44	(-0,63)	(-0,21)
46	0,42	(-0,05)
47	0,95	0,74
48	(-0,56)	(-1,13)

**Tabla 11. Cálculo del Z score respecto a las poblaciones de referencia (continuación).**

<b>PACIENTE</b>	<b>Z-score DS COLUMNA (respecto a población de Marco et al.)</b>	<b>Z-score DS COLUMNA (respecto a población de Del Río et al.)</b>
49	0,01	(-0,55)
51	(-0,53)	(-1,48)
52	(-2,03)	(-1,03)
53	(-0,60)	(-1,73)
54	(-0,62)	(-1,14)
55	0,17	(-0,73)
56	(-0,82)	(-1,54)
60	0,07	(-1,54)
61	(-0,79)	(-1,32)
63	0,47	0,73
65	1,46	1,05
66	(-0,03)	(-1,07)
67	(-1,27)	(-1,65)
68	0,94	0,72

### 3.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO

Dentro de los MRO, se estudian como marcadores de formación ósea las concentraciones séricas de: propéptido N-terminal del protocógeno tipo I (P1NP), fosfatasa alcalina total (FAT), fosfatasa alcalina ósea (FAO), osteocalcina (OC) y osteoprotegerina (OPG). Como marcadores de resorción ósea se han estudiado las concentraciones séricas de: vitamina D (25 OH vitamina D), 1,25 OH vitamina D, parathormona (PTH) y telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I ( $\beta$ -CTX) o también conocido como  $\beta$ -CrossLap. Las concentraciones séricas de interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) han sido medidos como biomarcadores de inflamación. Y las concentraciones séricas de calcio y fósforo fueron también determinados en ambos grupos.

## **P1NP**

Los niveles de P1NP serán medidos a través de una técnica de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, mediante un test comercial ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay). El pack de reactivos listos para su uso empleado ha sido Total P1NP®, Roche Diagnostics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas e 602 o módulo de inmunoensayos heterogéneos Elecsys. Según las recomendaciones técnicas del fabricante, las determinaciones precisan de 18 minutos utilizando una técnica sándwich.

La cuantificación de este marcador conlleva cuatro períodos:

1. Incubación: Se incuban juntos 20  $\mu$ L de suero de los pacientes y un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-P1NP.
2. En el segundo período, tras añadir un anticuerpo específico monoclonal anti-P1NP marcado con quelato de rutenio se forma un complejo sándwich que se fija a la fase sólida por interacción de la biotina y estreptavidina.
3. En el tercer período, la mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
4. En el último período los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva principal incluida en el código de barras del reactivo. Los resultados serán informados en nanogramos por mililitro (ng/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 5 ng/mL.

## **OC**

Este marcador se cuantificará siguiendo la misma técnica (ECLIA) a la utilizada para la determinación del P1NP. El pack de reactivos listos para su uso empleado ha sido OSTEOC®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 6000, módulo cobas e 602 o módulo de inmunoanálisis heterogéneo. Los resultados serán informados en nanogramos por mililitro (ng/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 0,500 ng/mL.

## ***β-CrossLap***

El kit de reactivo listo para su uso empleado ha sido β-CrossLaps/serum®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas e 602 o módulo de inmunoensayos heterogéneos Elecsys. Este marcador se ha cuantificado mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), al igual que el P1NP. Las fases seguidas son las mismas, con la excepción de la primera en la que se incuba 50 µL de suero del paciente con un anticuerpo monoclonal anti-β-CrossLaps marcado con quelato de rutenio, liberándose del antígeno de la muestra de los componentes séricos. Los resultados serán informados en nanogramos por mililitro (ng/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 0,01 ng/mL.

## ***PTH***

El kit de reactivo listo para su uso empleado es PTH-STAT®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas e 602 o módulo de inmunoensayos heterogéneos Elecsys. Este marcador se ha cuantificado mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), al igual que el P1NP. Las fases seguidas son las mismas, con la excepción de la primera en la que se incuba 50 µL de suero del paciente con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-PTH.

Los resultados serán informados en nanogramos por mililitro (ng/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 1,20 ng/mL.

### **IL-6**

El kit de reactivos listo para su uso empleado ha sido IL-6®, Roche Diagnósticos, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 6000, módulo cobas e 602 o módulo de inmunoanálisis heterogéneo. Este marcador se ha cuantificado mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), al igual que el P1NP. Las fases seguidas son las mismas, con la excepción de la primera en la que se incubó 30 µL de suero del paciente con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL-6. Los resultados serán informados en picogramos por mililitro (pg/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 1,5 pg/mL.

### **25 OH vitamina D**

El kit empleado es LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL (Diasorin Iberia S.A. Madrid, España). El analizador de medida es el LIAISON®. La vitamina D total es cuantificada mediante un inmunoensayo competitivo directo por quimioluminiscencia. Durante la primera incubación, la 25 OH vitamina D se disocia de su proteína de unión y se une al anticuerpo específico de la fase sólida. Transcurridos 10 minutos, se agrega el trazador (vitamina D unida a un derivado de isoluminol). Después de una segunda incubación de 10 minutos, el material libre se elimina en un ciclo de lavado. A continuación se agregan los reactivos iniciadores para dar lugar a una reacción quimioluminiscente rápida. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas con un fotomultiplicador y es inversamente proporcional a la concentración de 25 OH vitamina D presente en calibradores, controles y muestras. Los resultados serán informados en nanogramos por mililitro (ng/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 4 ng/mL.

### **1,25 OH vitamina D**

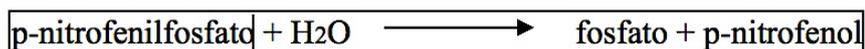
El kit de reactivos empleados es LIAISON® 1,25 OH Dyhydroxyvitamin D (Diasorin Iberia S.A. Madrid, España). El analizador de medida es el LIAISON®. Este marcador se ha cuantificado mediante un ensayo tipo sándwich de 3 pasos modificado que utiliza una proteína de fusión recombinante para capturar la molécula de 1,25 OH vitamina D y un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce específicamente el complejo formado por la proteína de fusión recombinante con la molécula de 1,25 OH vitamina D.

Durante la primera incubación, los calibradores, los controles o las muestras de paciente se incuban con la proteína recombinante (agente de unión) y tampón de ensayo. Tras esta incubación, se añade la fase sólida que contiene el anticuerpo monoclonal específico y se permite su unión con el complejo procedente de la primera incubación. Tras la segunda incubación, se realiza un ciclo de lavado para eliminar cualquier material no unido. El tercer paso consiste en añadir el conjugado e incubar. El material no unido se elimina con un segundo ciclo de lavado. A continuación se agregan los reactivos iniciadores y tiene lugar una reacción quimioluminiscente instantánea. La señal luminosa se mide en RLU (relative light units, unidades relativas de luz), con un fotomultiplicador y es proporcional a la concentración de 1,25 OH vitamina D presente en los calibradores, los controles y las muestras de pacientes. Los resultados se expresan en picomol por litro (pmol/L). Y el límite inferior de detección de la técnica es 1,70 pmol/L.

### **FAT**

El kit de reactivos empleados ha sido ALP2®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas c 502 o módulo de química clínica. Este marcador se ha cuantificado mediante un test colorimétrico según un método estandarizado, siguiendo las recomendaciones de “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” (IFCC), la cual

recomendó un procedimiento de referencia para la determinación de la fosfatasa alcalina a 37°C con una concentración optimizada de sustrato y el uso de 2-amino-2-metil-1-propanol como tampón además de los cationes magnesio y zinc. En presencia de iones magnesio y cinc, las fosfatasas desdoblan el p-nitrofenilfosfato a fosfato y p-nitrofenol.



El p-nitrofenol liberado es directamente proporcional a la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia. Los resultados se expresan en unidades por litro (U/L). Y el límite inferior de detección de la técnica es 5 U/L.

### **TNF alfa**

El kit de reactivos empleado para determinación de este marcador es DRG® TNF- $\alpha$ -ELISA (DGR Instruments GmbH, Alemania). El autoanalizador es el DS2 para ELISA de la casa comercial Palex®. Es un inmunoensayo de sensibilidad amplificada de enzima en fase sólida realizado en una placa de microtitulación. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales dirigido contra epítomos diferentes de TNF- $\alpha$ . Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (MAb1) unido al pocillo de una microplaca. Se incuba durante 2 horas en agitación. Se realiza un ciclo de lavado para eliminar lo que no se ha unido. En el siguiente paso se añade el conjugado que contiene el anticuerpo monoclonal (MAb2) marcado con una enzima: peroxidasa de rábano. Se incuba durante otras 2 horas en agitación, formándose lo que lo que conocemos como complejo sándwich. “MAb1 - TNF- $\alpha$  humano - MAb2 - peroxidasa de rábano”. Le sigue un ciclo de lavado para eliminar el anticuerpo marcado no unido a la enzima. El anticuerpo marcado unido a la enzima es medido mediante una reacción cromogénica. Se añade tetrametilbenzidina (TMB) como sustancia cromogénica y se incuba. El

## Método

siguiente paso es parar la reacción con una solución stop o de parada y se lee la densidad óptica de todos los pocillos en un lector de placa a 450 nm. La cantidad de renovación del sustrato se determina colorimétricamente mediante la medición de la absorbancia, que es proporcional a la concentración de TNF- $\alpha$ . Se representa una curva de calibración y la concentración de TNF- $\alpha$  en las muestras se determina por interpolación de la curva de calibración. Los resultados se expresan en picogramos/mililitro (pg/mL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 0,7 pg/mL.

### **OPG**

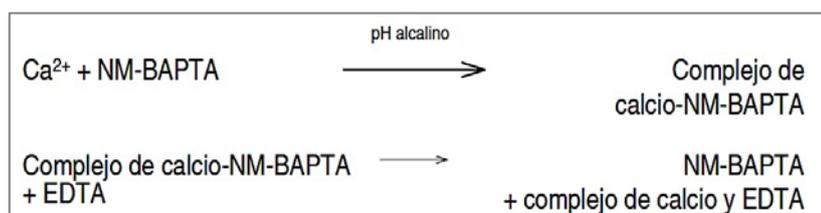
Este marcador, al igual que el TNF- $\alpha$ , se determinó mediante una técnica de ELISA, empleado el mismo analizador DS2 de Palex® y el kit de reactivos DRG® OPG ELISA (DGR Instruments GmbH, Alemania). En este ensayo el anticuerpo unido al pocillo de la microplaca es un anticuerpo monoclonal de cabra anti-OPG. Se añaden los calibradores, controles y muestras seguido de un 2º anticuerpo monoclonal de ratón anti-OPG biotinilado. Se incuba durante 4 horas y seguidamente se realiza un ciclo de lavado para eliminar los restos no unidos. En el siguiente paso, se añade el conjugado formado por una peroxidasa marcada con estreptavidina, formándose el complejo sándwich “1º anticuerpo – OPG – anticuerpo biotinilado –conjugado de peroxidasa marcado con estreptavidina”. Se incuba una hora y a continuación se realiza ciclo de lavado. La TBM es usado como sustrato de la peroxidasa. Finalmente una solución stop es añadida para parar la reacción. Los cambios de color van desde el azul al amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de OPG. Se lee la densidad óptica de todos los pocillos en un lector de placa (espectrofotómetro) a 450 nm. Los resultados se expresan en picomol/litro (pmol/L). Y el límite inferior de detección de la técnica es 0,07 pmol/L.

### **FAO**

El kit de reactivos empleado para medir la fosfatasa ósea es MicroVue BAP EIA, Quidel Corporation, Athens. El autoanalizador es el DS2 para ELISA de la casa comercial Palex®. El ensayo es un inmunoanálisis en formato de tiras de microtitulación, las cuales están recubiertas por un anticuerpo monoclonal anti-FAO. Éste captura la FAO de la muestra, controles y calibradores durante un periodo de incubación de 3 horas. Se realiza un ciclo de lavado para eliminar lo no unido y se añade el sustrato que contiene fosfato de p-nitrofenil (p-NPP). Se deja incubar unos 30 minutos y se realiza otro ciclo de lavado. El paso siguiente es añadir la solución de stop para la reacción y se procede a la lectura de la densidad óptica a 405 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de FAO presente en la muestra de prueba. Los resultados se expresan en Unidades/Litro (U/L). Y el límite inferior de detección es 0,7 U/L.

### **CALCIO**

El kit de reactivos listos para su uso empleado ha sido CA2®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas c 702 o módulo de química clínica. El principio del test consiste en, bajo condiciones alcalinas, los iones calcio reaccionan con el 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) para formar un complejo. En un segundo paso, el complejo formado reacciona con EDTA.



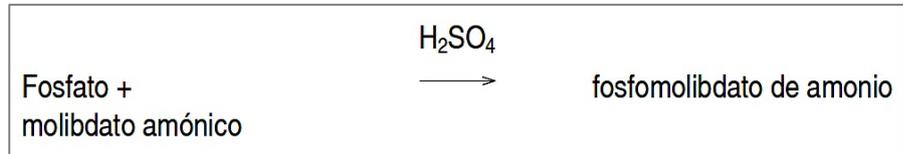
El cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de calcio y se mide por fotometría. Los resultados se expresan en milimol/litro (mmol/L) o

## Método

miligramos/decilitros (mg/dL). Y el límite inferior de detección de la técnica es 0,20 mmol/L o (0,8 mg/dL).

### **FÓSFORO**

El kit de reactivos listos para su uso empleado ha sido PHOS2®, Roche Diagnóstics, SL. (Madrid, España). El analizador de medida es el Cobas® 8000, módulo cobas c 702 o módulo de química clínica. La cuantificación de fósforo se hace por un método por radiación ultravioleta con molibdato. En presencia de ácido sulfúrico, el fosfato inorgánico forma un complejo de fosfomolibdato de amonio con el molibdato de amonio que se expresa con la fórmula  $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ .



La concentración del fosfomolibdato formado es directamente proporcional a la concentración de fosfato inorgánico y se mide fotométricamente. Los resultados se expresan en milimol/Litro (mmol/L) o miligramos/decilitros (mg/dL). El límite inferior de detección de la técnica es 0,10 mmol/L o (0,31 mg/dL).

## 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### **Análisis descriptivo**

Las variables cuantitativas se han expresado con medias y desviaciones típicas. Se ha usado el diagrama de barras para representar los valores de los Z Score de columna en desviaciones estándar respecto a la normalidad de las cohorte de Madrid y Barcelona (en grupos de  $>(-1)$  DE, de  $(-1)$ - $(-2)$  DE y  $< (-2)$  DE en el porcentaje del total de pacientes que se realizaron la densitometría (69% o 47 pacientes).

### **Análisis inferencial**

Inicialmente se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra a todas las variables del estudio. Mediante esta prueba se determinó una distribución normal de la mayoría de las variables permitiendo así el uso de test paramétricos. En las variables que no mostraron una distribución normal se recurrió a test no paramétricos.

A nivel del estudio densitométrico, para comparar la información de tipo cuantitativo (DMO Total de Columna total) entre el grupo FQ y la población de referencia de Del Río y Marco, se ha utilizado el test de comparación de medias t-Student para una muestra. El test de la U-Mann Whitney para variables independientes ha sido empleado para comparar las medias de la DMO Total de Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 en función del sexo y del grado de insuficiencia pancreática de los pacientes FQ (insuficientes pancreáticos: IP vs suficientes pancreáticos: SP) y para comparar los Z scores entre grupos de edad en función del sexo en nuestra cohorte de pacientes. Los Z Scores calculados en los pacientes FQ respecto a las poblaciones de referencia de Del Río y Marco ha sido representados gráficamente por grupos de edad.

Para medir la asociación lineal entre pares de variables normalmente distribuidas (DMO Total de Columna vs DMO L1, DMO L2, DMO L3, DMO L4), se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson y se ha aplicado el test de correlación o independencia para ver la significación de la asociación. Se procedió de igual forma para estudiar la asociación entre DMO Total de Columna vs edad, talla, peso e IMC en función del género. Se aplicó un modelo de regresión múltiple para evaluar los factores que influyen en la DMO total de columna.

Se ha representado a través de diagramas de dispersión con modelos de regresión lineal (se indicó el  $R^2$ , llamado coeficiente de determinación desde cada línea, que, expresado en porcentaje, explica el porcentaje de la variación de una variable que

podría ser explicado por la otra) la relación entre las variables estudiadas citadas anteriormente.

Para evaluar las diferencias de los MRO y biomarcadores de inflamación en ambos grupos del estudio se ha aplicado el test de comparación de medias t-Student para variables independientes. En el caso en el que no se han cumplido los requisitos para la aplicación del test, se ha empleado la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. De igual forma se ha procedido para comparar medias en el grupo de pacientes FQ en función del grado de insuficiencia pancreática (IP vs SP).

Para analizar si existe asociación lineal entre MRO y biomarcadores de inflamación frente a los Z Scores calculados en DE respecto a las poblaciones de referencia de Del Rio y Marco, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson en aquellas variables con distribución normal y el coeficiente de correlación Rho de Spearman en la que presentó una distribución no normal. Se procedió de igual manera para valorar la asociación entre los marcadores estudiados.

Un modelo de regresión logística multivariante fue aplicado para valorar la contribución de los marcadores estudiados en la ocurrencia de CFBD en los pacientes con FQ.

Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el programa informático IBM SPSS Statistics versión 20 (IBM Corporation, Armonk, New York).



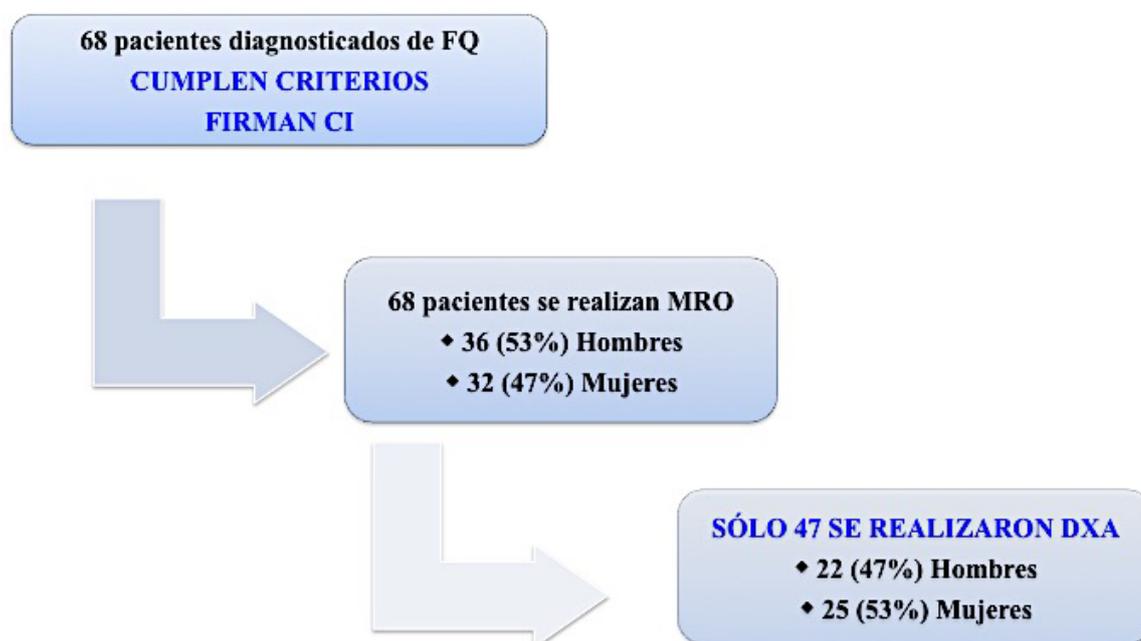
# RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

---

Del total de pacientes con FQ atendidos en la Unidad de Fibrosis del Hospital Universitario Virgen del Rocío, 68 pacientes cumplieron criterios de inclusión y se obtuvo conformidad de los tutores legales para la participación en el estudio (figura 16). En la figura y tabla siguientes se describen las características de los pacientes seleccionados.



**Figura 16. Características de los pacientes seleccionados.**

La cohorte de pacientes FQ la componen 68 pacientes (36 hombres y 32 mujeres), con rango de edad entre 6 y 16 años. 52 pacientes fueron IP (76,5%), los cuales recibieron suplementos con enzimas pancreáticas, y suplementos de vitamina D y K. La totalidad de la muestra, al igual que si se diferencia por sexo, presentan un valor promedio de FEV<sub>1</sub> mayor del 90%, aunque 16 pacientes presentan un FEV<sub>1</sub> <80% (23,5%, donde se observa el mismo número de niños que niñas). Del subgrupo de 47 pacientes que se realizan la DEXA, 13 pacientes presentan un FEV<sub>1</sub> <80% y 33 pacientes están normonutridos (70,2 %). Los valores medios de DMO en

este subgrupo se muestran en la tabla 12, junto con el genotipo y el resto de características de la totalidad de nuestra muestra.

**Tabla 12. Estadística descriptiva de muestras FQ.**

	<b>TOTAL</b>	<b>NIÑO</b>	<b>NIÑA</b>
<b>Peso (Kg)</b>	35,462 ± 11,502	35,983 ± 12,682	34, 875 ± 10,182
<b>Z score peso</b>	-0,543 ± 0,771	-0,499 ± 0,674	-0,593 ± 0,876
<b>Talla (cm)</b>	140,513 ± 15,798	141,828 ± 16,335	139,034 ± 15,296
<b>Z score talla</b>	-0,483 ± 1,205	-0,310 ± 0,946	-0,678 ± 1,434
<b>Edad (años)</b>	10,22 ± 2,829	10,19± 2,866	10,26 ± 2,807
<b>IMC</b>	17,458 ± 2,186	17,331 ± 2,284	17,600 ± 2,098
<b>Z score IMC</b>	-0,419 ± 0,623	-0,460 ± 0,619	-0,373 ± 0,635
<b>FEV<sub>1</sub> (%)</b>	91,228 ± 16,560	91,247 ± 17,015	91,206 ± 16,295
<b>Insuficiencia pancreática N (%)</b>	52 (76,5 %)	23 (63,9 %)	29 (90,6 %)
<b>Genotipo</b>			
✓ <b>Homocigoto ΔF508</b>	22 (32,4 %)	8 (22,2%)	14 (43,8%)
✓ <b>Heterocigoto ΔF508</b>	33 (48,5 %)	21 (58,3%)	12 (37,5%)
✓ <b>No mutación ΔF508</b>	13 (19,1 %)	7 (19,5%)	6 (18,7%)
<b>DMO L1</b>	0,710 ± 0,161	0,710 ± 0,189	0,710 ± 0,137
<b>DMO L2</b>	0,788 ± 0,153	0,774 ± 0,176	0,801 ± 0,132
<b>DMO L3</b>	0,813 ± 0,155	0,786 ± 0,180	0,837 ± 0,128
<b>DMO L4</b>	0,794 ± 0,159	0,754 ± 0,177	0,828 ± 0,135
<b>DMO Total Columna</b>	0,779 ± 0,155	0,661 ± 0,162	0,699 ± 0,119

\* Los valores son la media ± desviación estándar.

El grupo control en esta tesis doctoral está compuesto de 63 sujetos sanos del mismo rango de edad que los pacientes FQ ( $\geq 6 - 16$  años). En la tabla 13 se muestra la distribución por sexo y edad en el grupo control y FQ. Observamos que el grupo de mayor cuantía en pacientes FQ corresponden a los 7, 8 y 11 años y el de menor a los 16 años. En el grupo control los de mayor cuantía corresponden a los 7 y 10 años y el de menor a los 16 años también. Si nos centramos en el sexo masculino se observa igualdad en los grupos de 6, 8, 12 y 16 años de edad. La mayor diferencia se observa en los 10 años. A nivel del sexo femenino, la mayor diferencia entre grupos es observada a los 7, 11 y 12 años. No hay pacientes FQ

## Resultados

niñas de 15 y 16 años de edad. En el grupo control tampoco existen pacientes niñas de 16 años de edad.

**Tabla 13. Distribución de muestras por sexo y edad en grupo FQ y control.**

EDAD	GRUPO FQ			GRUPO CONTROL		
	HOMBRE	MUJER	N Total	HOMBRE	MUJER	N Total
6 años	2	3	5	2	2	4
7 años	7	2	9	6	6	12
8 años	4	5	9	4	2	6
9 años	5	3	8	4	3	7
10 años	1	2	3	7	1	8
11 años	5	5	10	3	2	5
12 años	3	5	8	3	2	5
13 años	1	3	4	4	2	6
14 años	2	4	6	1	3	4
15 años	5	0	5	2	3	5
16 años	1	0	1	1	0	1
TOTAL	36	32	68	37	26	63

**OBJETIVO 1: Estudio de la frecuencia de la alteración ósea en pacientes con FQ.**

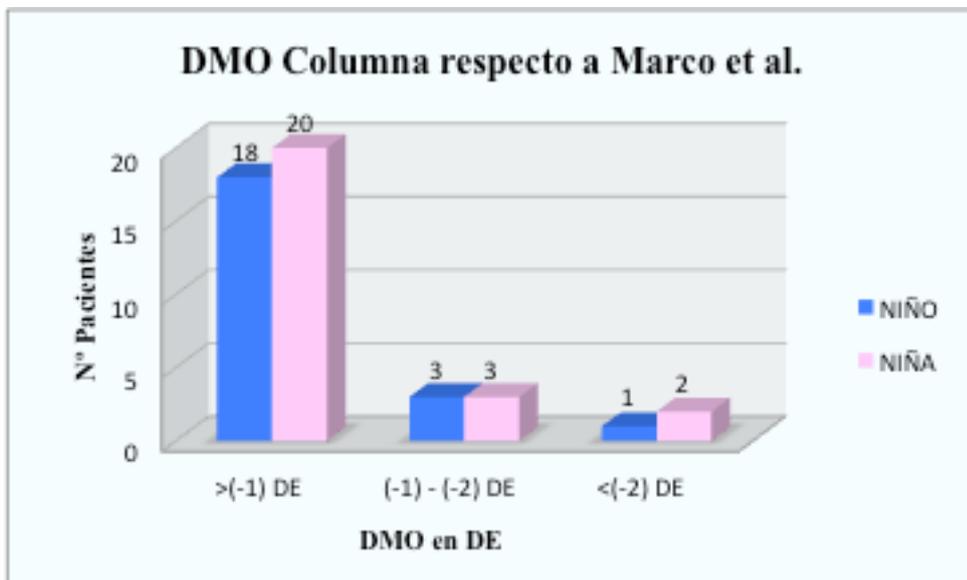
Los valores de Z Scores calculados frente a las cohortes de Madrid y Barcelona, fueron agrupados en grupos de  $>(-1)$  DE, de  $(-1)-(-2)$  DE y  $< (-2)$  DE y representados mediante diagrama de barras. Los resultados respecto a la población de normalidad madrileña, mostraron casi el 81 % de los pacientes con un Z Score  $>-1$  DE, con apenas diferencias entre sexo. El 12,77% de los pacientes presentaron un Z Score entre  $-1$  DE y  $-2$  DE sin diferencias entre sexos. Y los Z Scores  $>-2$  DE se han observado en el 6,38 % de los pacientes (tabla 14 y figura 17). Los resultados respecto a la población de normalidad catalana, mostraron algo más de la mitad de los pacientes con un Z Score  $>-1$  DE (51,06%), con igualdad de participación en porcentaje de niñas que niños. El intervalo entre  $-1$  DE y  $-2$  DE formado por el 40,43% de los pacientes presentó mayor diferencia en el sexo femenino. Y un 8,51 % han

presentando Z Scores mayor de  $-2$  DE, sin diferencias entre sexos (tabla 15 y figura 18). Los valores medios de DMO de columna obtenidos en este trabajo por grupo de edad y sexo se han contrastado con los encontrados en los estudios de Del Río et al. y Marco et al., mediante el cálculo del Z Score. Datos mostrados para el sexo masculino en la tabla 16 y para el sexo femenino en la tabla 17. La representación de los valores de Z Scores en DE para el sexo masculino se muestra en la figura 19. El valor 0 en la línea de abscisas en un grupo de edad indicaría que la media de las poblaciones de referencias para cada grupo de edad coincide con la nuestra, un valor positivo de Z que la media es superior y un valor negativo de Z que la media es inferior. Se observa ausencia de niños con edades de entre 12 y 13 años en nuestro grupo de pacientes. El resto de los grupos de edad muestran un Z score por debajo de la media, excepto en niños de 14 años respecto a la población madrileña que muestran un Z score de 0,06, en la media. Los Z scores más bajos son observados en los niños de 10 y 11 años (-1,54; -1,57) respecto a la población madrileña y en los de 14 años respecto a la población catalana (-1,54). La representación gráfica de los valores de Z Scores en el sexo femenino se muestra en la figura 20. Se observa ausencia de niñas con edades de entre 15 y 16 años en nuestro grupo de pacientes. Los valores de Z score más bajos se observan en niñas de 6 años (-2,50) respecto a la población madrileña y en niñas de 14 años (-2,06) respecto a la población catalana. Respecto de la población madrileña se observan valores muy cercanos a la media en el grupo de edad de 8 años (0,13) y respecto de la población catalana en los grupos de 8, 9, 10 y 11 años de edad (-0,35, 0,28; 0,15; -0,07) respectivamente.

Resultados

**Tabla 14. Z Scores de columna por sexo respecto a la población normal madrileña de Marco et al.**

	<b>Z Score DE COLUMNA LUMBAR (Respecto Marco et al.)</b>		
	<b>NIÑO</b>	<b>NIÑA</b>	<b>TOTAL</b>
>(-1) DE; N(%)	18 (81,82%)	20 (80%)	38 (80,85%)
(-1)- (-2) DE; N(%)	3 (13,64%)	3 (12%)	6 (12,77%)
<(-2) DE; N(%)	1 (4,54%)	2 (8%)	3 (6,38%)
TOTAL N(%)	22 (100%)	25 (100%)	47 (100%)



**Figura 17 . Distribución de los valores del Z Score en DE en columna por sexo, respecto a la población normal madrileña de Marco et al.**

Tabla 15. Z Scores de columna por sexo respecto a la población normal catalana de Del Río et al.

	Z Score DE COLUMNA LUMBAR (Respecto Rio et al.)		
	NIÑO	NIÑA	TOTAL
>(-1) DE; N(%)	12 (54,55%)	12 (48%)	24 (51,06%)
(-1)- (-2) DE; N(%)	8 (36,36%)	11 (44%)	19 (40,43%)
<(-2) DE; N(%)	2 (9,09%)	2 (8%)	4 (8,51%)
TOTAL N(%)	22 (100%)	25 (100%)	47 (100%)

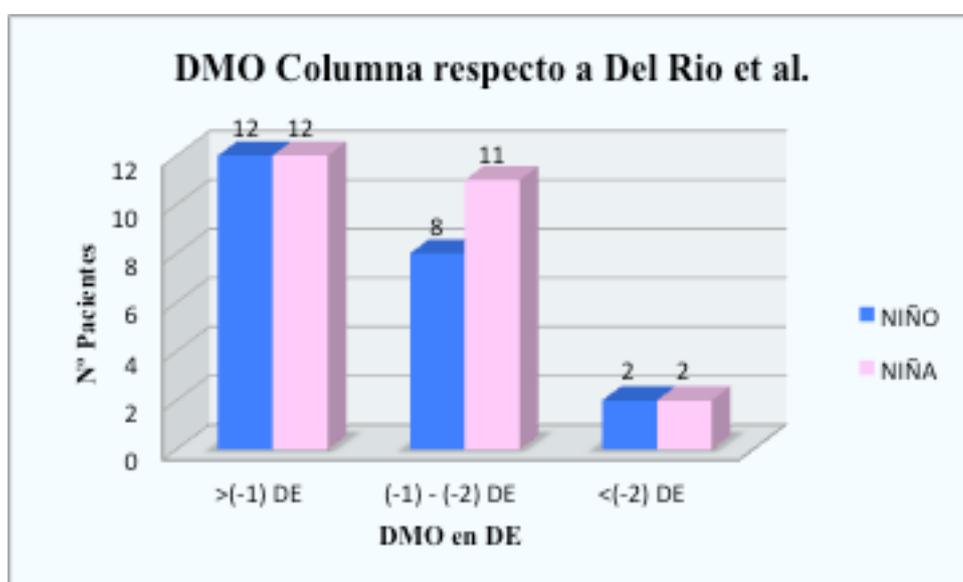
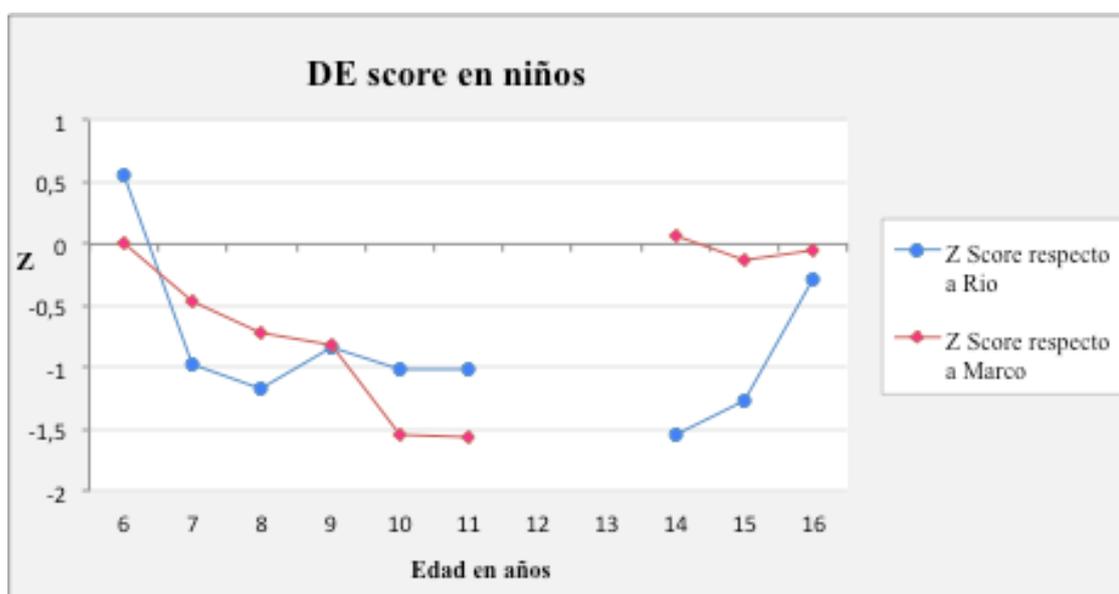


Figura 18. Distribución de los valores del Z Score en DE en columna por sexo, respecto a la población normal catalana de Del Río et al.

## Resultados

**Tabla 16 . Z Scores de columna respecto a poblaciones de referencia de Marco et al. y de Del Río et al. por edad sexo masculino.**

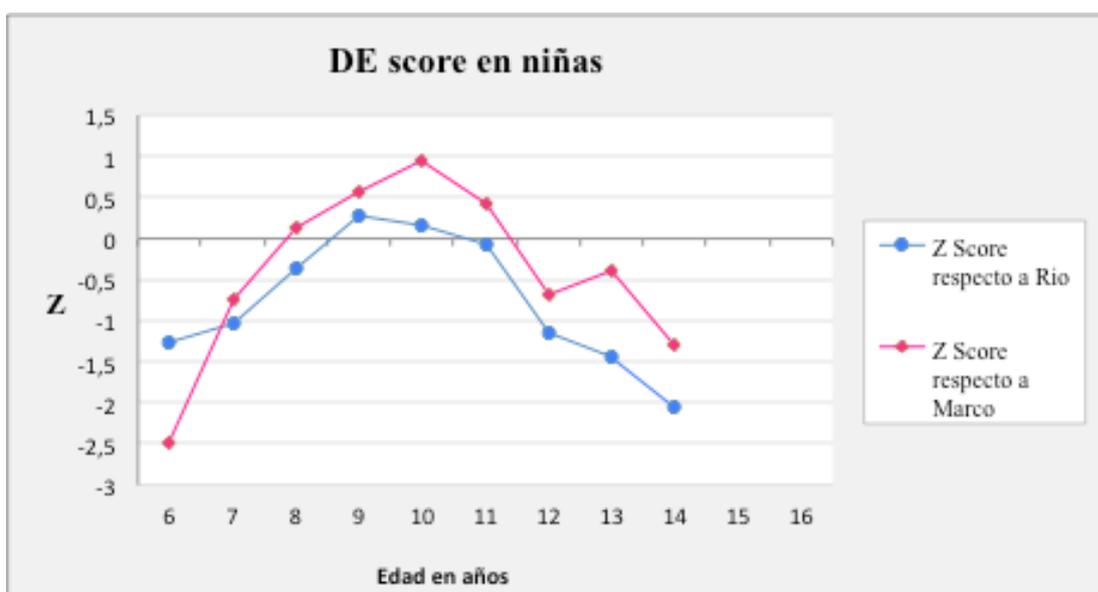
<b>EDAD</b>	<b>N</b>	<b>Media DMO Columna Lunar</b>	<b>Z score respecto a Marco et al.</b>	<b>Z score respecto a Rio et al.</b>
6 años	1	0,626	0,01	0,55
7 años	4	0,622	0,46	-0,97
8 años	2	0,617	-0,72	-1,16
9 años	4	0,668	-0,82	-0,84
10 años	1	0,658	-1,54	-1,02
11 años	3	0,683	-1,57	-1,02
14 años	1	0,896	0,06	-1,54
15 años	5	0,984	-0,13	-1,26
16 años	1	1,118	-0,05	-0,29



**Figura 19 . Representación de Z Scores de columna respecto a las dos poblaciones de referencia (madrileña y catalana) en función de la edad y sexo masculino.**

**Tabla 17. Z Scores de columna respecto a poblaciones de referencia de Marco et al. y de Del Río et al. por edad sexo femenino.**

<b>EDAD</b>	<b>N</b>	<b>Media DMO Columna Lunar</b>	<b>Z score respecto a Marco et al.</b>	<b>Z score respecto a Rio et al.</b>
6 años	2	0,570	-2,50	-1,25
7 años	2	0,618	-0,74	-1,02
8 años	5	0,722	0,13	-0,35
9 años	1	0,810	0,58	0,28
10 años	2	0,834	0,94	0,15
11 años	4	0,874	0,41	-0,07
12 años	4	0,866	-0,67	-1,15
13 años	3	0,925	-0,38	-1,45
14 años	2	0,884	-1,29	-2,06



**Figura 20 . Representación de Z Scores de columna respecto a las dos poblaciones de referencia (madrileña y catalana) en función de la edad y sexo femenino.**

**OBJETIVO 2: Valorar la alteración de la medición de la DMO en función de variables clínicas.**

La comparación de los valores de la DMO en nuestros pacientes agrupados por rangos de edad (6-10 años y >10 años) y sexo frente a las poblaciones de normalidad madrileña y catalana, mostraron diferencias significativas a nivel del sexo masculino en los rangos de edad de 6-10 años frente a las 2 cohortes utilizadas, madrileña y catalana con  $p=0,001$  y  $p<0,001$  respectivamente (tabla 18). Y a nivel del sexo femenino las diferencias significativas fueron observadas en el grupo de >10 años con  $p=0,036$  y  $p>0,001$  para cohorte madrileña y catalana, respectivamente (tabla 19). También se ha visto que no existen diferencias significativas entre ambos grupos a nivel del sexo (tabla 20 y 21).

Una correlación significativa positiva fue observada entre la DMO de columna total vs L1, L2, L3 y L4 ( $r=0,965$ ,  $r=0,987$ ,  $r=0,990$  y  $r=0,967$  con  $p<0,001$ ) (tabla 22) y frente a las variables edad ( $r$  total= $0,839$ ,  $r$  niño= $0,894$ ,  $r$  niña= $0,806$  con  $p<0,001$ ) (tabla 23), talla ( $r$  total= $0,830$ ,  $r$  niño= $0,870$ ,  $r$  niña= $0,866$  con  $p<0,001$ ) (tabla 24), peso ( $r$  total= $0,819$ ,  $r$  niño= $0,868$ ,  $r$  niña= $0,836$  con  $p<0,001$ ) (tabla 25), e IMC ( $r$  total= $0,573$ ,  $r$  niño= $0,603$ ,  $r$  niña= $0,585$  con  $p<0,001$ ) (tabla 26). Se han representado a través de diagramas de dispersión con modelos de regresión lineal (figura 21: DMO columna total vs L1, figura 22: DMO columna total vs L2, figura 23: DMO columna total vs L3, figura 24: DMO columna total vs L4, figura 25: DMO columna total vs edad, figura 26: DMO columna total vs talla, figura 27: DMO columna total vs peso y figura 28: DMO columna total vs IMC).

No se hallaron diferencias significativas en la DMO en función del sexo (tabla 27), ni del grado de insuficiencia pancreática (tabla 28).

El análisis de regresión lineal múltiple (tabla 29), muestra que la edad, el género, el IMC, la PTH, la  $\beta$ -CrossLap y la OPG fueron predictores significativos de la DMO de

columna ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,013$ ,  $p = 0,038$  y  $p = 0,047$ , respectivamente). Estas variables explican el 87% de la variabilidad de la DMO columna ( $r^2 = 0,866$ ;  $p < 0,0001$ ). La variable más potente de entre las analizadas en el modelo es la edad con un 74%, y le siguen el sexo, IMC, PTH,  $\beta$ -CrossLap y OPG (27%, 24%, 16%, 13% y 12%, respectivamente).

**Tabla 18. Comparación de la DMO Columna Total entre el grupo FQ y las poblaciones de normalidad madrileña y catalana en los dos grupos de edad en niños.**

	<b>MEDIA</b>	<b>DS</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
DMO Columna Total FQ (Grupo 6-10 años) N = 12	0,640	0,038	0,615 - 0 664	0,001
DMO Normalidad Columna <b>Madrileña</b> (Grupo 6-10 años) N = 64	0,693	0,031		
DMO Columna Total FQ (Grupo 6-10 años) N= 12	0,640	0,038	0,615 - 0 664	<0,001
DMO Normalidad Columna <b>Catalana</b> (Grupo 6-10 años) N = 51	0,713	0,031		
DMO Columna Total FQ (Grupo >10 años) N = 10	0,898	0,057	0,770 – 1,027	0,307
DMO Normalidad Columna <b>Madrileña</b> (Grupo >10 años) N = 31	0,960	0,135		
DMO Columna Total FQ (Grupo >10 años) N = 10	0,898	0,057	0,770 – 1,027	0,054
DMO Normalidad Columna <b>Catalana</b> (Grupo >10 años) N = 43	1,024	0,164		

## Resultados

**Tabla 19. Comparación de la DMO Columna Total entre el grupo FQ y las poblaciones de normalidad madrileña y catalana en los dos grupos de edad en niñas.**

	<i>MEDIA</i>	<i>DS</i>	<i>IC 95%</i>	<i>P</i>
DMO Columna Total FQ (Grupo 6-10 años) N = 12	0,705	0,107	0,637 - 0 774	0,791
DMO Normalidad Columna <b>Madrileña</b> (Grupo 6-10 años) N = 65	0,714	0,044		
DMO Columna Total FQ (Grupo 6-10 años) N= 12	0,705	0,107	0,637 - 0 774	0,230
DMO Normalidad Columna <b>Catalana</b> (Grupo 6-10 años) N = 57	0,745	0,061		
DMO Columna Total FQ (Grupo >10 años) N = 13	0,885	0,084	0,834 – 0,936	0,036
DMO Normalidad Columna <b>Madrileña</b> (Grupo >10 años) N = 55	0,940	0,085		
DMO Columna Total FQ (Grupo >10 años) N = 13	0,885	0,084	0,834 – 0,936	<0,001
DMO Normalidad Columna <b>Catalana</b> (Grupo >10 años) N = 27	1,003	0,097		

**Tabla 20. Comparación de Z scores de columna entre grupos de edad en niños.**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>RANGO PROMEDIO</b>	<b>p</b>
<b>Z score respecto a la población de Marco et al</b>	<b>6-10 años</b>	12	9,50	0,113
	<b>&gt;10 años</b>	10	13,50	
<b>Z score respecto a la población de Del Rio et al</b>	<b>6-10 años</b>	12	11,92	0,741
	<b>&gt;10 años</b>	10	11,00	

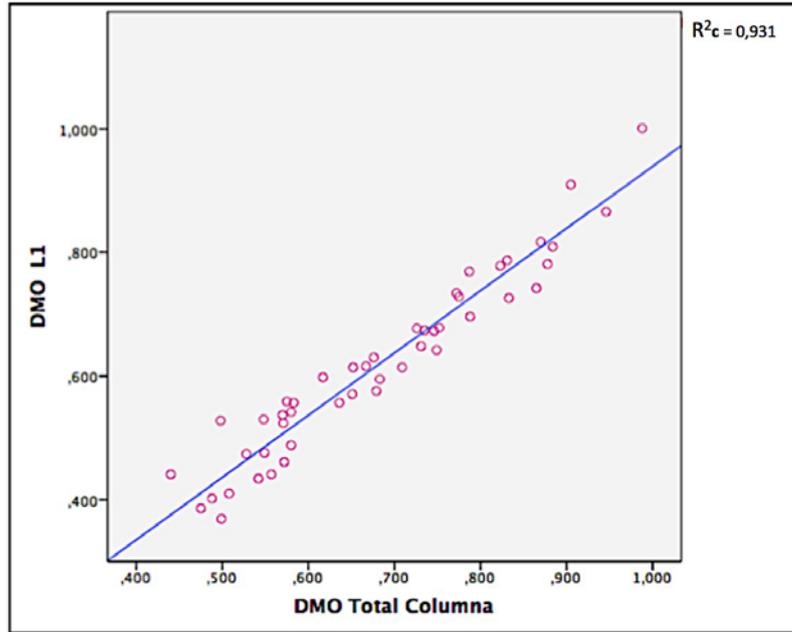
**Tabla 21. Comparación de Z scores de columna entre grupos de edad en niñas.**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>RANGO PROMEDIO</b>	<b>p</b>
<b>Z score respecto a la población de Marco et al</b>	<b>6-10 años</b>	12	13,83	0,586
	<b>&gt;10 años</b>	13	12,23	
<b>Z score respecto a la población de Del Rio et al</b>	<b>6-10 años</b>	12	14,54	0,314
	<b>&gt;10 años</b>	13	11,58	

**Tabla 22. Análisis de correlación entre DMO Total Columna vs DMO L1, L2, L3, L4.**

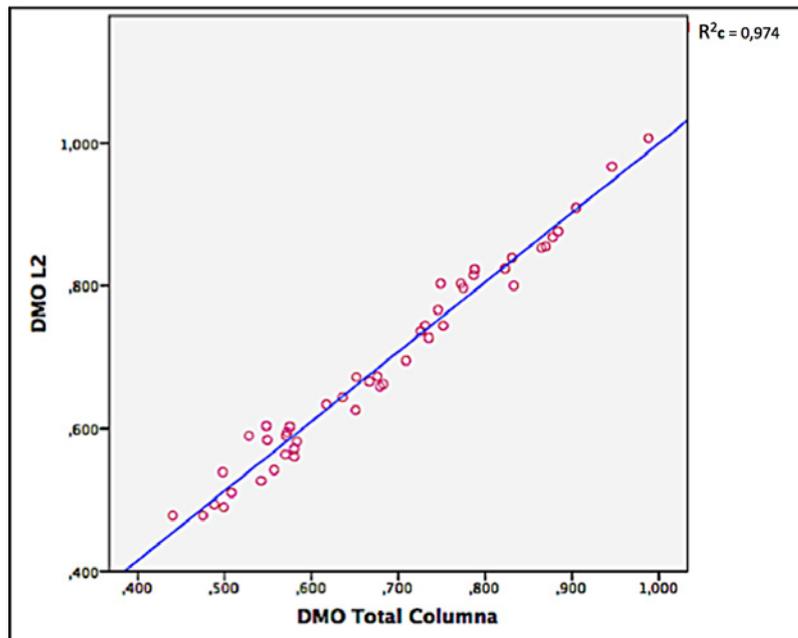
	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>DMO Total Columna vs DMO L1</b>	0,965	< 0,001
<b>DMO Total Columna vs DMO L2</b>	0,987	< 0,001
<b>DMO Total Columna vs DMO L3</b>	0,990	< 0,001
<b>DMO Total Columna vs DMO L4</b>	0,967	< 0,001

## Resultados



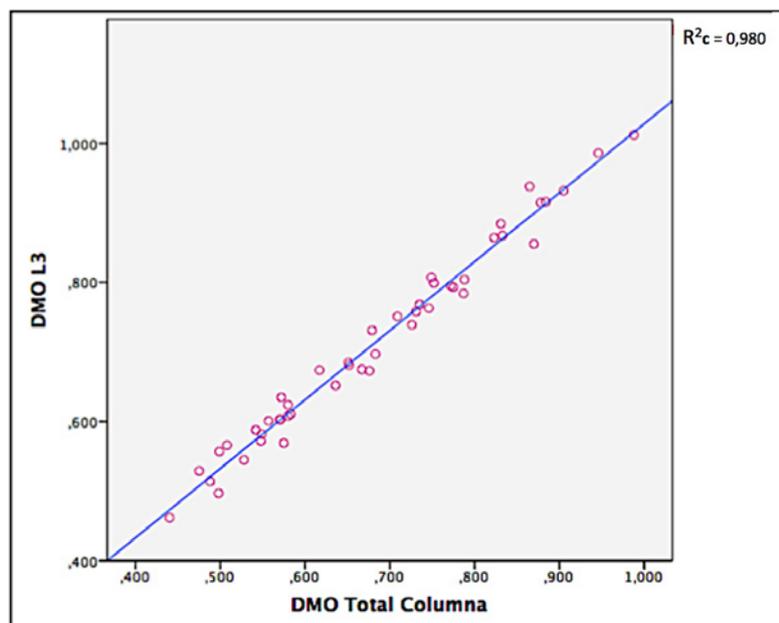
**Figura 21 . Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L1.**

Se objetiva una mayor concentración de los datos en los valores tanto bajos como medios. La línea de regresión obtenida posee un  $R^2 = 0,932$ .



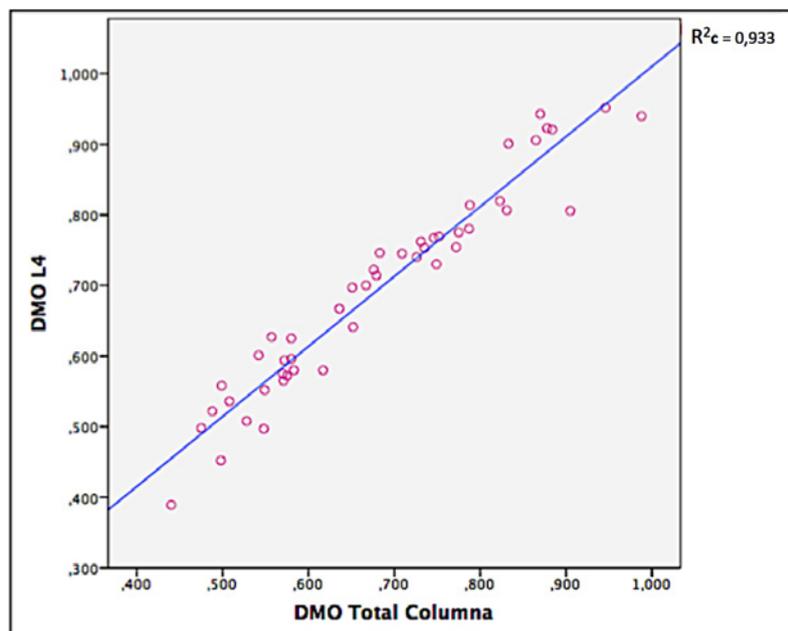
**Figura 22. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L2.**

Se objetiva una mayor concentración de los datos en los valores tanto bajos como medios. El modelo regresión muestra una  $R^2_{ajustada} = 0,974$ .



**Figura 23. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L3.**

Se objetiva una mayor concentración de los datos en los valores tanto bajos como medios. La línea de regresión obtenida posee un  $R^2 = 0,981$ .



**Figura 24. Diagrama de dispersión DMO Columna Total vs DMO L4.**

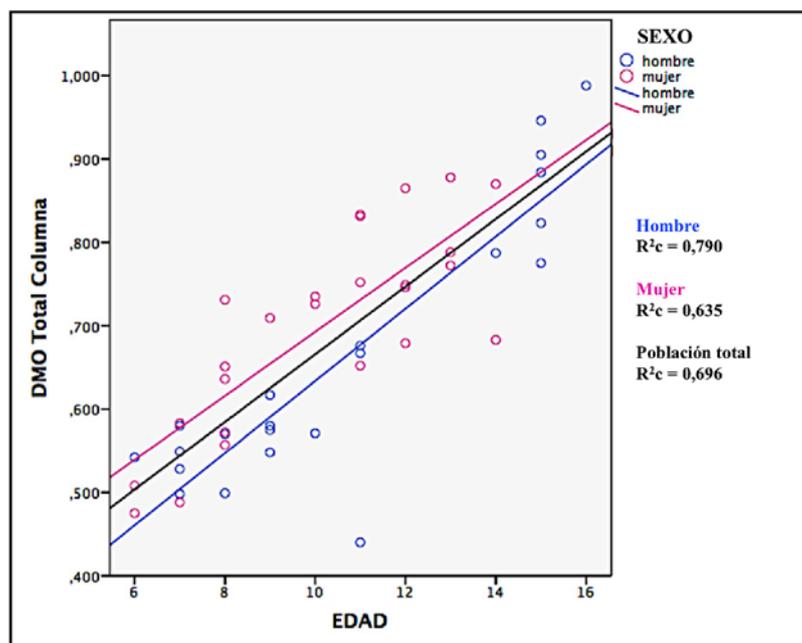
Se objetiva una mayor concentración de los datos en los valores medios. En edades tempranas como tardías se observa una ligera dispersión de los valores. La línea de regresión obtenida posee un  $R^2 = 0,934$ .

## Resultados

**Tabla 23. Análisis de correlación entre Edad vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.**

	TOTAL		NIÑO		NIÑA	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>DMO L1</b>	0,858	<0,001	0,905	<0,001	0,789	<0,001
<b>DMO L2</b>	0,850	<0,001	0,899	<0,001	0,810	<0,001
<b>DMO L3</b>	0,807	<0,001	0,876	<0,001	0,769	<0,001
<b>DMO L4</b>	0,772	<0,001	0,834	<0,001	0,790	<0,001
<b>DMO Total Columna</b>	0,839	<0,001	0,894	<0,001	0,806	<0,001

\* La correlación es significativa al nivel de 0,01



**Figura 25. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Total Columna vs edad.**

Se objetivan valores más altos en niñas que en niños a edades más tempranas y medias y valores más altos en niños a mayor edad. Se observa un incremento más exponencial de DMO de columna en niñas que en niños a medida que pasa la edad.

Tabla 24. Análisis de correlación entre Talla vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3, DMO L4 según sexo.

	TOTAL		NIÑO		NIÑA	
	r	p	r	p	r	p
DMO L1	0,863	<0,001	0,889	<0,001	0,855	<0,001
DMO L2	0,842	<0,001	0,873	<0,001	0,865	<0,001
DMO L3	0,807	<0,001	0,853	<0,001	0,857	<0,001
DMO L4	0,746	<0,001	0,802	<0,001	0,827	<0,001
DMO Total Columna	0,830	<0,001	0,870	<0,001	0,866	<0,001

\* La correlación es significativa al nivel de 0,01

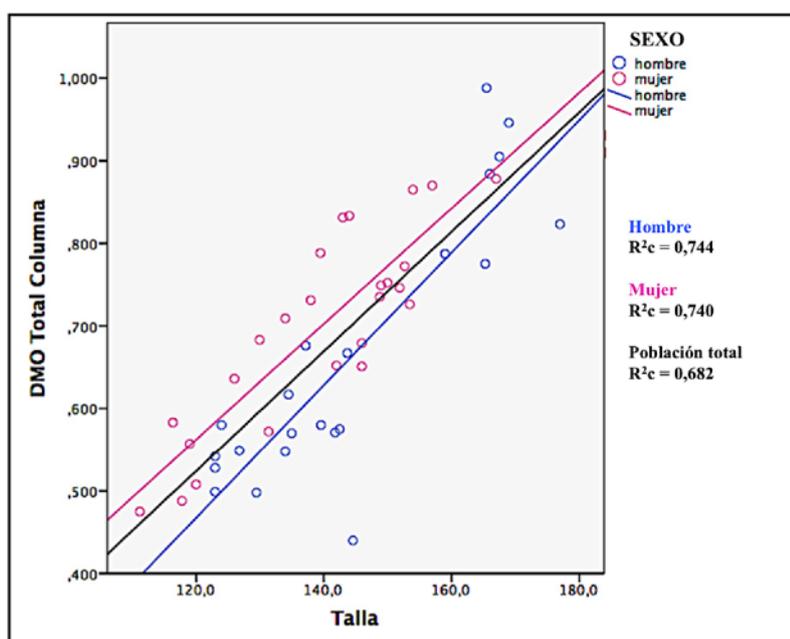


Figura 26. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Columna Total vs talla.

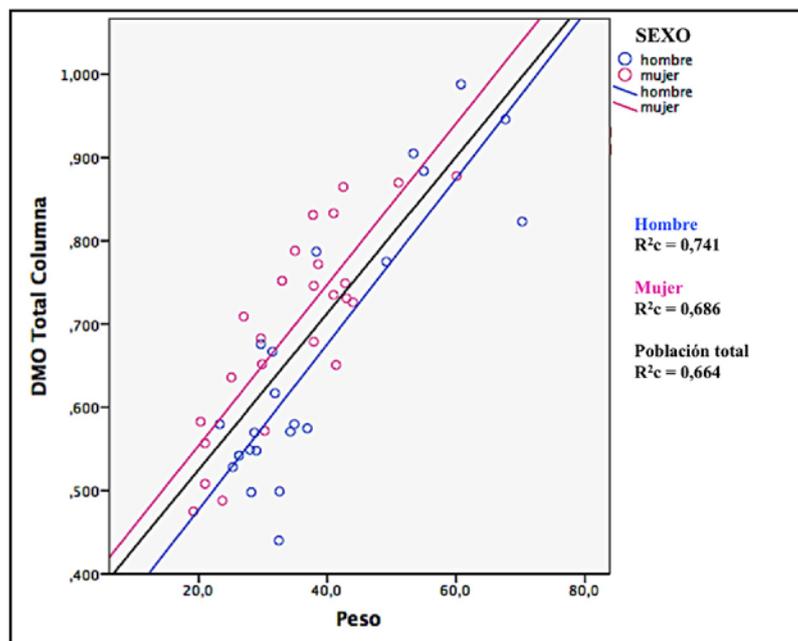
Se objetivan valores de DMO de columna en niña más altos a tallas más baja y medias, observando una mayor dispersión de los datos entre sexos a tallas más bajas. Los valores de DMO de columna más altos son observados en niños a tallas más altas Se observa un incremento más exponencial en la DMO de columna en niñas a medida que aumenta la talla.

## Resultados

**Tabla 25. Análisis de correlación entre Peso vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.**

	<i>TOTAL</i>		<i>Niño</i>		<i>Niña</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>DMO L1</b>	0,822	<0,001	0,845	<0,001	0,806	<0,001
<b>DMO L2</b>	0,823	<0,001	0,865	<0,001	0,825	<0,001
<b>DMO L3</b>	0,809	<0,001	0,877	<0,001	0,818	<0,001
<b>DMO L4</b>	0,759	<0,001	0,823	<0,001	0,830	<0,001
<b>DMO Total Columna</b>	0,819	<0,001	0,868	<0,001	0,836	<0,001

\* La correlación es significativa al nivel de 0,01



**Figura 27. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Columna Total vs peso.**

A pesos más bajos, las diferencias entre sexos en la DMO de columna es mayor que a pesos mayores. Se observa una mayor concentración de los valores de DMO de columna de niños a pesos más bajos. Se objetiva un incremento exponencial en los valores de DMO de columna en ambos sexos, a medida que aumenta el peso, siendo más pronunciado en niñas que niños.

Tabla 26. Análisis de correlación entre IMC vs DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo.

	TOTAL		NIÑO		NIÑA	
	r	p	r	p	r	p
DMO L1	0,526	<0,001	0,526	0,012	0,538	0,006
DMO L2	0,567	<0,001	0,589	0,004	0,572	0,003
DMO L3	0,581	<0,001	0,648	0,001	0,559	0,004
DMO L4	0,569	<0,001	0,605	0,003	0,618	0,001
DMO Total Columna	0,573	<0,001	0,603	0,003	0,585	0,002

\* La correlación es significativa al nivel de 0,01

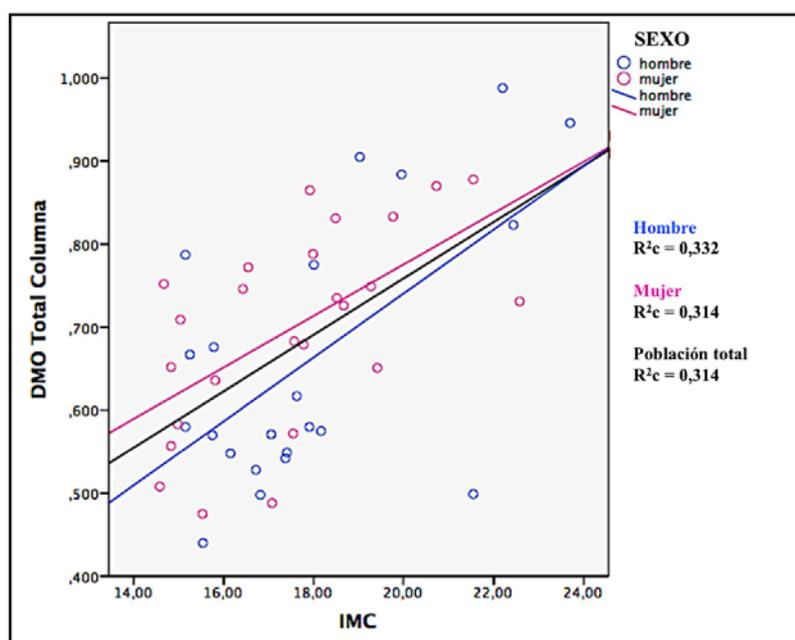


Figura 28. Diagrama de dispersión por sexo entre DMO Total Columna vs IMC.

A valores más bajos de IMC, las diferencias entre sexos en DMO de columna es mayor que a valores de IMC más altos, presentando los niños valores más elevados de DMO de columna.

## Resultados

**Tabla 27. Análisis de la DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según sexo en el grupo FQ.**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>RANGO PROMEDIO</b>	<b>p</b>
<b>DMO L1</b>	Niño	22	22,89	0,601
	Niña	25	24,98	
<b>DMO L2</b>	Niño	22	22,07	0,365
	Niña	25	25,70	
<b>DMO L3</b>	Niño	22	20,82	0,136
	Niña	25	26,80	
<b>DMO L4</b>	Niño	22	20,75	0,127
	Niña	25	26,86	
<b>DMO Total Columna</b>	Niño	22	21,55	0,250
	Niña	25	26,16	

**Tabla 28. Análisis de la DMO Total Columna, DMO L1, DMO L2, DMO L3 y DMO L4 según el grado de insuficiencia pancreática (IP/SP) en el grupo FQ.**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>RANGO PROMEDIO</b>	<b>p</b>
<b>DMO L1</b>	IP	35	24,59	0,617
	SP	12	22,29	
<b>DMO L2</b>	IP	35	25,03	0,380
	SP	12	21,00	
<b>DMO L3</b>	IP	35	24,90	0,442
	SP	12	21,38	
<b>DMO L4</b>	IP	35	24,81	0,487
	SP	12	21,63	
<b>DMO Total Columna</b>	IP	35	24,90	0,442
	SP	12	21,38	

\* IP: Insuficiencia pancreática; SP: Suficiencia pancreática

**Tabla 29. Resultado del análisis de regresión lineal múltiple.**

<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>Desv. error</b>	<b>p</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Edad</b>	0,061	0,080	<0,001	0,030 - 0,044
<b>Género</b>	0,080	0,018	<0,001	0,042 - 0,117
<b>IMC</b>	0,015	0,004	0,001	0,006 - 0,023
<b>PTH</b>	0,001	0,0005	0,013	0,0003 - 0,0021
<b>β-CrossLap</b>	-0,0000413	0,00002	0,038	-0,00008 - -0,000002
<b>OPG</b>	-0,025	0,012	0,047	-0,050 - -0,0003

DMO columna total: variable dependiente

**OBJETIVO 3: Evaluar las diferencias de biomarcadores inflamatorios y de remodelado óseo entre pacientes con FQ y sin FQ (controles) y valorar la contribución de los marcadores en la ocurrencia de CFBD en los pacientes FQ.**

El estudio de los marcadores de remodelado óseo y biomarcadores inflamatorios entre pacientes con FQ y sin FQ (grupo control) mostró diferencias significativas entre grupos en varios marcadores estudiados. Se observan valores medios más bajos en todos los marcadores de formación ósea medidos en el grupo FQ, siendo estadísticamente significativos: FAO y la OPG ( $p=0,040$  y  $p<0,001$ ) respectivamente. Por el contrario, este mismo grupo, muestra niveles más altos en la mayoría de marcadores de reabsorción ósea: PTH, TNF- $\alpha$ , IL-6,  $\beta$ -CrossLap y 25 OH vitamina D. Tan sólo presentan niveles más bajos respecto a los controles la 1,25 OH vitamina D. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas a nivel de PTH, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -CrossLap y 1,25 OH vitamina D con una  $p=0,005$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,004$  y  $p<0,001$  respectivamente. También se observaron niveles de calcio más bajos en el grupo FQ que en los controles, siendo significativos ( $p<0,001$ ) y no se encontraron diferencias a nivel del fósforo siendo éstos más elevados en el grupo FQ (tabla 30 y 31). No se observó sin embargo, diferencias estadísticamente significativas entre los marcadores estudiados y el grado de insuficiencia pancreática, salvo para el marcador de formación ósea osteocalcina ( $p=0,001$ ). Se hallaron valores medios más bajos de los marcadores de formación ósea P1NP, OC y OPG y niveles más altos de los marcadores de resorción ósea PTH, IL-6, TNF- $\alpha$  en el grupo FQ IP respecto a al grupo FQ SP. Los niveles de fósforo y 25 OH vitamina D fueron similares (tabla 32).

Ninguno de los marcadores estudiados mostró correlación con los Z scores de columna (tabla 33 y 34). Adicionalmente encontramos correlaciones positivas

## Resultados

significativas moderadas en ambos grupos, entre OC vs P1NP ( $r=0,676$ , en ambos grupos), OC vs FAT y FAO ( $r=0,335$ ;  $r=0,344$ , grupo FQ) y ( $r=0,665$ ;  $r=0,678$ , grupo control), P1NP vs FAT y FAO ( $r=0,554$ ;  $r=0,539$ , grupo FQ) y ( $r=0,680$ ;  $r=0,723$ , grupo control),  $\beta$ -CrossLap vs FAT y FAO ( $r=0,483$ ;  $r=0,510$ , grupo FQ) y ( $r=0,384$ ;  $r=0,463$ , grupo control), P1NP vs  $\beta$ -CrossLap ( $r=0,553$ , grupo FQ) y ( $r=0,623$ , grupo control). IL-6 vs  $\text{TNF}\alpha$  ( $r=0,490$ , grupo control). Una correlación negativa fue vista entre la vitamina D y la PTH ( $r=-0,308$ , grupo FQ) y ( $r=-0,358$ , grupo control), al igual que para la IL-6 vs P1NP y FAT ( $r=-0,359$ ;  $r=-0,285$ ) en el grupo control. Otras correlaciones positivas débiles fueron observadas entre otros marcadores. Todos los datos mostrados en las tablas 35, 36, 37 y 38.

El modelo (conjunto de variables que vemos en la tabla 39: PTH, calcio, 1,25 OH vitamina D,  $\text{TNF}\alpha$  y OPG) es significativo, explica el 72% ( $r^2=0,720$ ) de la enfermedad ósea y clasifica correctamente al 85,6% de los casos. Se incluyeron 119 casos. En la tabla 39 se muestran los valores de Odd Ratio para las variables, pudiendo observar que la PTH junto con el  $\text{TNF}\alpha$  actúan como factores de riesgo y el calcio, 1,25 OH vitamina D y OPG son protectores. Observamos en el caso del  $\text{TNF}\alpha$  que por cada picogramo se multiplica 2,17 el riesgo de producir enfermedad ósea. Para la PTH se vio que por cada aumento en 10 picogramos se incrementa el riesgo en 1,95. Para la variable protectora calcio se observó que por cada miligramo protege 8,7 veces de tener enfermedad ósea. En la variable 1,25 OH vitamina D, se observó que por cada aumento en 50 picogramos, protege casi el triple (2,86) que sino se tuviera esa cantidad. Y en el caso de la OPG, tener un picomol menos multiplica el riesgo de presentar enfermedad ósea 5 veces, es decir, por cada picomol de OPG, produce 5 veces más protección.

**Tabla 30. Análisis de los marcadores de remodelado óseo según grupos (FQ vs Control).**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESVIACIÓN TÍPICA</b>	<b>p</b>
<b>P1NP</b>	FQ	68	475,081	212,263	0,131
	CONTROL	63	539,506	271,329	
<b>PTH</b>	FQ	68	36,587	19,509	0,005
	CONTROL	63	27,850	12,967	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FQ	66	9,821	3,934	< 0,001
	CONTROL	63	6,537	2,168	
<b><math>\beta</math>-CrossLap</b>	FQ	68	1406,060	546,881	0,004
	CONTROL	63	1166,529	409,339	
<b>Calcio</b>	FQ	68	9,883	0,495	< 0,001
	CONTROL	63	10,263	0,549	
<b>FAT</b>	FQ	68	224,332	69,272	0,625
	CONTROL	63	231,198	89,159	
<b>FAO</b>	FQ	68	102,222	35,868	0,040
	CONTROL	61	116,971	44,709	
<b>25 OH vitamina D</b>	FQ	68	81,866	33,383	0,708
	CONTROL	63	80,027	20,687	
<b>1,25 OH vitamina D</b>	FQ	68	120,912	26,574	< 0,001
	CONTROL	63	150,910	49,001	
<b>Fósforo</b>	FQ	68	5,050	0,577	0,347
	CONTROL	61	4,952	0,597	
<b>OC</b>	FQ	64	78,917	26,295	0,460
	CONTROL	61	82,969	34,624	
<b>OPG</b>	FQ	66	2,140	0,686	< 0,001
	CONTROL	63	2,810	0,632	

**Tabla 31. Análisis del marcador IL-6 según grupos (FQ vs Control).**

	<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>RANGO PROMEDIO</b>	<b>p</b>
<b>IL-6</b>	FQ	64	66,52	0,370
	CONTROL	63	61,44	

## Resultados

**Tabla 32. Análisis de los marcadores de remodelado óseo según el grado de insuficiencia pancreática (IP/SP) en el grupo FQ.**

	<i>GRUPO FQ</i>	<i>N</i>	<i>RANGO PROMEDIO</i>	<i>p</i>
<b>P1NP</b>	IP	52	33,31	0,370
	SP	16	38,38	
<b>PTH</b>	IP	51	36,56	0,122
	SP	15	27,81	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	IP	51	34,41	0,477
	SP	15	30,40	
<b><math>\beta</math>-CrossLap</b>	IP	52	34,35	0,908
	SP	16	35,00	
<b>Calcio</b>	IP	52	33,27	0,354
	SP	16	38,50	
<b>FAT</b>	IP	52	35,24	0,578
	SP	16	32,09	
<b>FAO</b>	IP	52	34,56	0,965
	SP	16	34,31	
<b>25 OH vitamina D</b>	IP	52	33,26	0,206
	SP	16	38,53	
<b>1,25 OH vitamina D</b>	IP	52	32,82	0,339
	SP	16	39,97	
<b>Fósforo</b>	IP	52	34,92	0,750
	SP	16	33,13	
<b>OC</b>	IP	49	28,27	0,001
	SP	15	46,33	
<b>OPG</b>	IP	50	32,52	0,463
	SP	16	36,56	
<b>IL-6</b>	IP	50	32,67	0,877
	SP	14	31,89	

\* IP: Insuficiencia pancreática; SP: Suficiencia pancreática

**Tabla 33. Análisis de correlación entre los marcadores de remodelado óseo vs Z Score columna madrileña y Z Score columna catalana.**

	<b>Z SCORE COLUMNA MADRILEÑA</b>		<b>Z SCORE COLUMNA CATALANA</b>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>P1NP</b>	-0,011	0,940	0,238	0,107
<b>PTH</b>	0,128	0,389	0,153	0,304
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,134	0,382	0,310	0,038
<b><math>\beta</math>-CrossLap</b>	-0,153	0,304	-0,630	0,672
<b>Calcio</b>	0,074	0,619	0,085	0,569
<b>FAT</b>	-0,195	0,189	0,039	0,794
<b>FAO</b>	-0,232	0,116	-0,004	0,979
<b>25 OH vitamina D</b>	-0,138	0,355	-0,083	0,579
<b>1,25 OH vitamina D</b>	0,127	0,394	0,155	0,299
<b>Fósforo</b>	-0,177	0,235	-0,038	0,797
<b>OC</b>	0,034	0,824	0,104	0,495
<b>OPG</b>	-0,123	0,420	-0,125	0,413

**Tabla 34. Análisis de correlación entre el marcador IL-6 vs Z Score columna madrileña y Z Score columna catalana.**

	<b>Z SCORE COLUMNA MADRILEÑA</b>		<b>Z SCORE COLUMNA CATALANA</b>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>IL-6</b>	0,112	0,467	-0,190	0,217

Tabla 35. Análisis de correlación entre los marcadores en el grupo FQ.

	P1NP	PTH	TNF- $\alpha$	$\beta$ CLap	Ca	FAT	FAO	Vit.D	1,25Vit.D	P	OC	OPG
P1NP	1	NS	NS	0,553	0,282	0,554	0,539	NS	0,333	0,485	0,676	0,277
PTH	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	-0,308	NS	NS	NS	NS
TNF- $\alpha$	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\beta$ CLap	0,553	NS	NS	1	NS	0,483	0,510	NS	0,321	0,417	0,480	NS
Ca	0,282	NS	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FAT	0,554	NS	NS	0,483	NS	1	0,918	NS	0,280	0,372	0,335	NS
FAO	0,539	NS	NS	0,510	NS	0,918	1	NS	0,306	0,298	0,344	NS
Vit.D	NS	-0,308	NS	NS	NS	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS
1,25Vit.D	0,333	NS	NS	0,321	NS	0,280	0,306	NS	1	NS	NS	0,246
P	0,485	NS	NS	0,417	NS	0,372	0,298	NS	NS	1	0,312	0,356
OC	0,676	NS	NS	0,480	NS	0,335	0,344	NS	NS	0,312	1	NS
OPG	0,277	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,246	0,356	NS	1

Tabla 36. Análisis de correlación entre los marcadores vs IL-6 en el grupo FQ.

	P1NP	PTH	TNF- $\alpha$	$\beta$ CLap	Ca	FAT	FAO	Vit.D	1,25Vit.D	P	OC	OPG
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 37. Análisis de correlación entre los marcadores en el grupo control.

	P1NP	PTH	TNF- $\alpha$	$\beta$ CLap	Ca	FAT	FAO	Vit.D	1,25Vit.D	P	OC	OPG
P1NP	1	NS	NS	0,623	NS	0,680	0,723	NS	NS	0,469	0,676	NS
PTH	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	-0,358	NS	NS	0,395	NS
TNF- $\alpha$	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\beta$ CLap	0,623	NS	NS	1	NS	0,384	0,463	NS	NS	0,640	0,540	NS
Ca	NS	NS	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FAT	0,680	NS	NS	0,384	NS	1	0,950	NS	NS	NS	0,665	NS
FAO	0,723	NS	NS	0,463	NS	0,950	1	NS	NS	0,284	0,678	NS
Vit.D	NS	-0,358	NS	NS	NS	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS
1,25Vit.D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1	NS	NS	NS
P	0,469	NS	NS	0,640	NS	NS	0,284	NS	NS	1	NS	NS
OC	0,676	0,395	NS	0,540	NS	0,665	0,678	NS	NS	NS	1	NS
OPG	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1

Tabla 38. Análisis de correlación entre los marcadores vs IL-6 en el grupo control.

	P1NP	PTH	TNF- $\alpha$	$\beta$ CLap	Ca	FAT	FAO	Vit.D	1,25Vit.D	P	OC	OPG
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 39. Análisis de regresión logística multivariante.

	<i>B</i>	<i>p</i>	<i>OR (Exp (B))</i>	<i>IC 95% para Exp (B)</i>	
				<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
<b>PTH</b>	0,67	0,007	1,070	1,019	1,123
<b>Calcio</b>	-2,159	0,005	0,115	0,025	0,524
<b>1,25 vit D</b>	-0,021	0,016	0,979	0,962	0,996
<b>IL-6</b>	-0,146	0,063	0,864	0,741	1,008
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,776	0,00003	2.173	1,514	3,118
<b>OPG</b>	-1,668	0,001	0,189	0,073	0,489



# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

---

La DMO baja y la osteoporosis se han documentado en muchas enfermedades crónicas incluso en niños, adolescentes y adultos jóvenes, donde múltiples factores relacionados con la enfermedad o el tratamiento pueden afectar el metabolismo óseo. La fibrosis quística es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen CFTR. En general, es grave y, en la mayoría de los casos, produce muerte prematura por insuficiencia respiratoria. Además de pulmonar, existen complicaciones pancreáticas, hepáticas, intestinales y otras. No existe una terapia estándar y la supervivencia depende de un tratamiento de apoyo continuo. En las últimas tres décadas, las nuevas estrategias terapéuticas agresivas para la enfermedad pulmonar, la atención al estado nutricional y la atención médica terciaria han hecho posible una mayor supervivencia en estos pacientes, pero a menudo se observan secuelas a largo plazo, como la CFBD.

La evaluación de la densidad ósea en el niño o adolescente se ha vuelto cada vez más común a medida que se reconoce que los grupos de pacientes jóvenes tienen riesgo de osteoporosis (246). La osteoporosis se define como “trastorno esquelético caracterizado por una resistencia ósea comprometida que predispone a un mayor riesgo de fractura”. La fortaleza ósea refleja la integración de dos características principales: densidad ósea y calidad ósea. La calidad ósea se refiere a la arquitectura, el turnover, la acumulación de daños (por ejemplo, las microfracturas) y la mineralización. Debido a que la osteoporosis es una condición silenciosa y no existe una herramienta clínica para evaluar la calidad ósea, se requiere la medición de la densidad mineral ósea para identificar a los pacientes antes de que se produzcan las fracturas (247). La masa esquelética aumenta progresivamente durante el crecimiento con una fase acelerada en el momento de la aceleración del crecimiento prepuberal (248). Por lo tanto, la cantidad de hueso que se gana durante la adolescencia es el principal contribuyente al pico de masa ósea, que es un

determinante importante de la osteoporosis y el riesgo de fractura en la edad adulta (204). Por lo tanto, la evaluación del esqueleto en crecimiento es el foco de creciente interés tanto en pediatría como en medicina de adultos.

Un grupo expertos de ISCD en 2013 establecieron criterios para el diagnóstico densitométrico de osteoporosis en niños. Concluyeron que el término de baja masa ósea era más apropiado para informar de valores de Z Score < -2 (usando bases de datos pediátricas de controles emparejados por edad), describiendo una baja densidad ósea para la edad cronológica, como terminología más adecuada. También recomendaron que en un paciente pediátrico, este diagnóstico no se debe realizar basándose únicamente en una medición de la DMO. También se debe establecer evidencia de fragilidad esquelética (249).

La densitometría ósea es la herramienta ampliamente utilizada para la evaluación cuantitativa del esqueleto. La medición del contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea en niños y adolescentes se ha vuelto ampliamente disponible y se han creado bases de datos de referencia pediátricas (250). Existen varios métodos para medir la DMO y el más utilizado es el DEXA.

Diferentes trabajos se han servido de esta técnica para cuantificar la evolución de la masa ósea durante la infancia y la adolescencia en columna lumbar, tanto en poblaciones normales como patológicas y han concluido que el pico de masa ósea está prácticamente alcanzado entre los 20 y 25 años de edad (235,238,251).

Se sabe que la tasa de recambio óseo es mucho más rápida en los huesos trabeculares que en los corticales. Además, el hueso trabecular parece ser más sensible a los cambios minerales que el cortical. Por lo tanto, estudiamos los cambios en la mineralización ósea mediante absorciometría de rayos X de energía dual en el nivel de la columna lumbar, que se compone principalmente de hueso trabecular.

## Discusión

En nuestro estudio se muestran valores promedio de DMO de columna disminuidos en los dos grupos en niños (6-10 años, >10 años) respecto a las poblaciones de referencia madrileña y catalana, hallando diferencias significativas en los grupos de 6-10 años: (0,640 vs 0,693;  $p=0,001$ ), (0,640 vs 0,713;  $p<0,001$ ) respectivamente. En el caso del sexo femenino, los valores promedio de DMO de columna fueron menores en los dos grupos respecto a las poblaciones de referencia madrileña y catalana, observándose diferencias significativas en el grupo de >10 años con respecto a la población madrileña y catalana (0,885 vs 0,940;  $p=0,036$  y 0,885 vs 1,003;  $p<0,001$ ).

Un 8,51% de los pacientes mostraron un Z score de columna por debajo de -2 DS respecto a la población catalán y un 6,38% lo hicieron frente a la población madrileña.

Observamos que la DMO correlaciona positivamente con la edad, la talla, el peso y el IMC. No observamos diferencias significativas en la DMO respecto al género, ni al grado de insuficiencia pancreática. El análisis de regresión múltiple mostró como variables significativamente predictoras a la edad, el género, IMC, PTH,  $\beta$ -CrossLap y OPG ( $P<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,013$ ,  $p=0,038$  y  $p=0,047$ , respectivamente), explicando el 87% de la variabilidad de la DMO de columna en el grupo de pacientes FQ.

En un estudio realizado por Sermet et al. (252) se evaluó la densidad mineral ósea en columna lumbar de 114 pacientes con FQ, incluyendo 25 niños menores de 6 años, 53 niños prepuberales entre 6 y 10 años y 36 adolescentes entre 11 y 18 años de edad. Los valores de Z score de columna fueron calculados en referencia a una población sana de niños y adolescentes parisinos emparejados para la edad, sexo y estado puberal. La base de datos control incluyó 317 niños y adolescentes de 1 a 20 años de edad, con estado nutricional normal, viviendo en el mismo área geográfica y sin enfermedades cardíacas, renal o hepática conocidas (253–255).

Estos autores encontraron que los valores medios de Z score de columna en el grupo de niños más jóvenes (< 6 años) eran significativamente más bajos que lo normal (-0,96). Se mantuvo estable en el grupo de 6-10 años de edad (-0,91), no observándose diferencias significativas entre grupos y decreció en el grupo de adolescentes (11-18 años) aunque no significativamente (-1,4). Z scores de columna < -1 fueron hallados en el 34% de los pacientes con enfermedad pulmonar leve y estado nutricional normal. La proporción de pacientes con un valor de Z score de columna <-2 DE no fue significativa entre los tres grupos, pero tendió al incremento en el grupo de adolescentes (28% en niños < 6 años, 22% en el grupo de 6-10 años y 34% en el de adolescentes). Además se la DMO de columna lumbar, estos autores midieron los niveles de vitamina D, PTH, OC, IGF-1, calcio y fósforo. Los niveles de calcio y fósforo se hallaron dentro de los niveles normales para todos los pacientes. El 90% presentó niveles de vitamina D por debajo del nivel de 30 ng/mL y el 9% mostró niveles de PTH por encima de 46 pg/mL. El grupo de adolescentes (11-18 años) mostró niveles de vitamina D significativamente más bajos respecto a los otros 2 grupos (niños < 6 años:  $p=0,0005$ ; grupo de 6-10 años:  $p=0,007$ ), al igual que se vio con la IGF-1 con los 2 grupos (niños < 6 años:  $p=0,02$ ; grupo de 6-10 años:  $p=0,004$ ), y en el caso de la OC se observaron diferencia significativas entre los grupos < 6 años vs 6-10 años,  $p=0,05$  y 6-10 años vs 11-18 años;  $p=0,008$ . Todos los pacientes recibieron suplementación con vitamina D de 2000-4000 U/día.

Los autores de este estudio sugieren que el origen de la CFBD en la infancia temprana puede ser independiente del estado nutricional o la severidad de la enfermedad.

En un estudio Gronowitz et al. (256) se evaluó la densidad mineral ósea en pacientes FQ en crecimiento normal y también estudiaron la relación entre marcadores bioquímicos de nutrición, como el calcio, fósforo, calcitonina y vitamina

## Discusión

D. 70 pacientes FQ de edad entre 6-49 años fueron estudiado (34 hombres y 36 mujeres), de los cuales 30 fueron mayores de 20 años (15 hombres y 15 mujeres). DEXA fue la técnica usado para medir densitometría en columna lumbar y cuello femoral mediante Hologic QDR-2000. Los valores de referencia se obtuvieron del fabricante. Observaron que la DMO de columna se incrementó con la edad pero en promedio fue más baja que en la población normal, tanto para hombres ( $p=0,02$ ) como para las mujeres ( $p<0,001$ ). La puntuación z promedio de la DMO disminuyó en la columna lumbar tanto en niños como en adultos, siendo  $-0.7 \pm 1.0$  y  $-0.5 \pm 1.0$ , respectivamente. El 37 % de los pacientes mostraron puntuaciones de Z score de columna disminuidas. No encontraron diferencias en las puntuaciones Z score en columna en niños y adultos con respecto al género. Tampoco se observó correlación entre Z score y el calcio y vitamina D. Los niveles séricos de calcio, fósforo y calcitonina fueron normales en todos los pacientes, 2 pacientes presentaron niveles deficientes de vitamina D y 11 de ellos tuvieron valores por debajo de 18 ng/mL.

Un análisis de regresión múltiple mostró que las variables edad, calcitonina, peso en Z score, talla en Z score y el FEV<sub>1</sub> explicaban el 44% de la variabilidad del Z score de columna lumbar ( $p<0,001$ ). Los coeficientes correlación parciales fueron 0,27, -0,28, -0,06, 0,04 y 0,31 respectivamente, por lo que cuando se eliminó el peso y la talla del modelo se vio que no cambió el  $r^2=0,44$  y los coeficientes parciales fueron prácticamente iguales (edad: 0,26, calcitonina: -0,26 y FEV<sub>1</sub> : 0,30). Estos autores observaron una disminución temprana de la densidad ósea vertebral en niños con FQ pero con una buena nutrición.

En un estudio realizado por Douros et al. (257) se estudian 81 pacientes FQ de edades entre 4 y 23 años sin un criterio de selección específico. Una encuesta sobre los hábitos alimentarios fue realizada para estimar la toma de calorías y de calcio. Los pacientes fueron descritos en función de los siguientes parámetros, los cuales se piensan juegan un papel importante en la mineralización ósea: edad, género,

criterio de Tanner, IMC, FEV<sub>1</sub> para evaluar la función pulmonar, Shwachman-Kulczyck score para evaluar la severidad de la enfermedad, uso de glucocorticoides orales en los 6 meses anteriores, presencia de pseudomona aureginosa, presencia de insuficiencia pancreática exocrina y niveles de 25 OH vitamina D. Los pacientes fueron divididos en 3 grupos: niños (hasta los 10 años), adolescentes (niños hasta los 20 años y niñas hasta los 18 años) y jóvenes adultos (por encima de los 20 años). DMO fue medida en columna lumbar (L1-L4) por DXA Hologic QDR-1000 y fue expresada en Z scores. Como base de referencia para la DMO, usaron aquella provista por el fabricante de Hologic para caucásicos. La DMO en Z scores esperada para población sana es 0. Los autores encontraron una densidad ósea reducida en un elevado porcentaje de pacientes. Un 33% se encontraron entre Z scores de -1 y -2,5 DE (27 pacientes), y 9 pacientes estaban en Z scores por debajo de -2,5 DE (11%). Los Z scores fueron más bajos que los valores de 0 esperados en el grupo de niños, adolescentes y jóvenes adultos ( $p=0,004$ ,  $p<0,001$  y  $p=0,048$  respectivamente), pero no se observaron diferencias entre los tres grupos ( $p=0,16$ ). 69 pacientes (85%), eran insuficientes pancreáticos y recibían enzimas pancreáticas como suplemento, 58 (72%) fueron infectados con P.aureginosa y 7 (9%) estaban en tratamiento con glucocorticoides orales. FEV<sub>1</sub> por debajo de 80 % fue encontrado en 26 pacientes (32%). Sólo un paciente (1%) presentó deficiencia de vitamina D (<5 ng/mL); 72 pacientes (89%) presentó insuficiencia (5-30 ng/mL) y 8 pacientes (10%) fueron suficientes (30-100). Aunque según la guía europea sobre mineralización ósea en FQ (31), aún no se ha alcanzado un consenso respecto a los niveles de vitamina D en suero óptimos requeridos para optimizar la mineralización ósea en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Pero hace una recomendación para prevenir su deficiencia, recomendando una concentración mínima de 20 ng/mL. En esta tesis, todos los pacientes FQ presentan niveles muy por encima de este valor, pero hay que tener en cuenta que todos los pacientes IP reciben suplementación con vitamina D, siendo un total de 49 pacientes (72%). Los

## Discusión

autores del estudio mencionado arriba observan una media de DMO en Z scores no significativa entre género (media  $\pm$  DE =  $-1,17 \pm 1,30$  y  $-0,74 \pm 1,25$  para niños y niñas respectivamente,  $p=0,13$ ). También observaron una correlación positiva significativa entre los Z scores de columna y la vitamina D ( $r= 0,27$ ,  $p=0,013$ ), con los Z scores del IMC ( $r=0,36$ ,  $p<0,001$ ) y una correlación negativa con la presencia de insuficiencia pancreática ( $r=-0,32$ ,  $p=0,003$ ). En esta tesis, en comparación a lo estudiado en este trabajo, encontramos una correlación positiva significativa entre la DMO de columna y el IMC ( $r=0,573$ ;  $p<0,001$ ). Estos autores además mostraron en un análisis de regresión múltiple que el género y la vitamina D fueron predictores significativos del Z score de columna ( $p=0,006$  en ambos), con una  $r^2=0,50$ , que expresa el 50 % de variabilidad total del Z score columna.

Chirita et al. (258) realizan un estudio con el objetivo de describir los cambios longitudinales en la cantidad mineral ósea o CMO y la influencia de factores en niños con fibrosis quística. En este análisis retrospectivo se evalúan 100 niños (50 niñas) a los que se le realizó DXA de columna mediante sistema Lunar. De éstos, 48 y 24 tuvieron 2 y 3 DXA respectivamente, durante un periodo de 10 años. Los datos fueron expresados en CMO Z score ajustado por edad, sexo, etnia y área ósea. De entre los marcadores de enfermedad, tomaron el FEV<sub>1</sub>, para valorar la función pulmonar, corticoides orales o inhalados como tratamiento durante el año previo a la realización de la DXA, intolerancia a la glucosa, suplementación alimenticia. La talla y el IMC en Z scores fueron usados como datos antropométricos y se evaluaron los niveles de vitamina D y PTH como marcadores óseos en todos pacientes. De los 100 niños estudiados, estos autores observaron valores de CMO iniciales de columna lumbar en Z score  $>0,5$  DE en el 13% de los niños, entre  $-0,5$  y  $0,5$  en un 50% y  $< -0,5$  se halló el resto (37%). 10% presentó valores iniciales  $<-1$  DE. Un 78% de los niños que tuvieron valores iniciales de CMO Z score de columna  $>-0,5$  DE y 35% por debajo de  $-0,5$ , mostraron una disminución de los valores en las evaluaciones sucesivas. Sin embargo, la media de CMO en Z score de columna no

mostró diferencias significativas en las posteriores evaluaciones (-0,51; -0,64; -0,56;  $p=0,178$ ). Los determinantes significativos del CMO de columna en Z score fueron el FEV1, seguido de IMC en Z score y los niveles iniciales de vitamina D, tras un análisis de regresión múltiple.

Los niveles de MRO se incrementan durante la pubertad y alcanzan su pico poco después de la madurez sexual. La mayoría de los estudios que miden los marcadores de recambio óseo en suero indican que los pacientes con FQ tienen una combinación de degradación ósea acelerada y formación ósea inadecuada.

Hasta el momento, los datos relativos a los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo en la población pediátrica son limitados, a veces contradictorios. En los niños sanos, la formación ósea es mayor que la resorción. En la edad pediátrica no es fácil interpretar los resultados de los marcadores bioquímicos porque, por una parte, pueden reflejar solo un proceso de crecimiento normal y, por otra, porque no existe, para la gran mayoría de ellos, rango de valores normales.

En nuestro estudio encontramos una concentración media de los marcadores de formación ósea OC, P1NP, FAT, FAO y OPG más baja en niños con FQ respecto a los controles, siendo la FAO y OPG significativas en ambos grupos ( $p<0,040$  y  $p<0,000$  respectivamente). Respecto a los marcadores de resorción ósea obtuvimos valores medios más altos en el grupo FQ respecto a los controles en todos los marcadores medidos (PTH,  $\beta$ CrossLaps, 25 OH vitamina D, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) excepto la 1,25 OH vitamina D. Mostraron diferencias significativas PTH,  $\beta$ CrossLaps, 1,25 OH vitamina D y TNF- $\alpha$  ( $p<0,005$ ,  $p<0,004$ ,  $p<0,000$ ,  $p<0,000$  respectivamente). También se midieron niveles de fósforo y calcio en suero, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos a nivel del calcio ( $p<0,000$ ). Esta condición resulta en un desacoplamiento del equilibrio entre la formación ósea y los procesos de resorción, al igual que es mostrado en otros estudios (259–263), siendo un factor desfavorable para el desarrollo de estos pacientes.

Le Heron et al. (264) utilizaron un modelo de cultivo de osteoblastos humanos primarios y demostraron que la pérdida de la actividad del canal de cloruro regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, produce una disminución de la expresión de OPG en pacientes con FQ. Los datos del estudio sugieren que en las células óseas de pacientes con FQ, la pérdida de actividad de CFTR puede provocar una mayor resorción ósea inflamatoria (por reducción de OPG y un aumento de la PGE<sub>2</sub>), y podría contribuir a la baja densidad mineral ósea encontrada en niños pequeños con FQ, independientemente de su estado nutricional y la gravedad de la enfermedad pulmonar (252,265). Stalvety et al. también demostraron una diferenciación alterada de los osteoblastos con una producción reducida de OPG en células cultivadas de ratones Knockout (Cftr -/-) (266). Otros estudios genéticos en ratones Knockout (Cftr -/-) han demostrado que la invalidación de CFTR causa una baja masa ósea y una microarquitectura alterada, un fenotipo asociado con la disminución de la formación ósea y el aumento de la reabsorción ósea (267–269), aunque los mecanismos celulares que causan estos efectos son aún desconocidos.

Shead et al. (270) mostraron, por primera vez en pacientes adultos con FQ, un nivel sérico de OPG más bajo en comparación con los controles, (1664 pg/mL, IQR 1545-1740 vs 2494 pg/mL, IQR 1805-3066,  $p < 0,05$ ).

En la enfermedad de la FQ, la inflamación crónica conduce a niveles elevados de citoquinas inflamatorias, como IL-6 y el TNF- $\alpha$ , pudiendo afectar al crecimiento de los niños. Actúan sobre el cartílago de crecimiento y también a la ingestión de nutrientes, por su poder anorexígeno. Además, también pueden tener repercusiones negativas sobre la pubertad, afectando al estirón puberal. El aumento de la IL-6 circulante induce una disminución proporcional de IGF-I circulante, sin afectar a la secreción de GH, en animales de experimentación y en seres humanos. Estudios en roedores demuestran que cuando se neutraliza la actividad de la IL-6, se

recupera el crecimiento (271). La inflamación crónica ha sido considerada un factor importante debido al impacto de las citoquinas en la mineralización ósea (272,273).

El TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas con mayor efecto sobre el cartílago del crecimiento, inhibiendo la expresión de genes que codifican moléculas de matriz y regulan la expresión de un factor fundamental (Sox9) para la diferenciación y formación del cartílago. Además, estudios in vitro han puesto de manifiesto la capacidad para alterar el crecimiento longitudinal de los huesos del metatarso, inhibir la proliferación de condrocitos (células que se encargan de mantener la matriz cartilaginosa) en el cartílago en crecimiento y aumentar la apoptosis de los condrocitos.

En un estudio realizado por MacRae et al. (274) se observa que el tratamiento de animales con antagonistas del TNF- $\alpha$  logra una recuperación del crecimiento sin normalizar los valores de IGF-I.

En el trabajo de Le Heron et al. (264) mencionado anteriormente, se muestran datos de una menor secreción del marcador de formación ósea OPG cuando cultivos de osteoblastos humanos son tratados con un inhibidor del CFTR y estimulados con TNF- $\alpha$  frente a cultivos controles no tratados con el inhibidor de CFTR ( $124,1 \pm 32,8$  pg/mL /  $10^6$  cel vs  $434,1 \pm 58,1$  pg/mL /  $10^6$  cel).

Datos clínicos recientes han informado que las complicaciones de la FQ con los polimorfismos del gen TNF junto con la alta producción de TNF- $\alpha$  se asocian con una disminución de la densidad ósea (275). Li et al. (276) demostraron que la supresión de la señalización basal de TNF- $\alpha$  en modelos óseos in vivo e in vitro mejoró la diferenciación y la mineralización de los osteoblastos y mejoró la formación ósea, lo que sugiere que los antagonistas de TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B pueden representar nuevos agentes anabólicos para la obtención del pico de masa ósea máximo y/o la mejora de la pérdida ósea patológica.

## Discusión

En un estudio realizado por Street et al. (277) se midieron valores de OC y P1NP en pacientes con FQ y se observaron diferencias respecto de los valores de referencia (262) para la OC ( $27,8 \pm 4,5 \mu\text{g/L}$  y  $7,0 \pm 3,1 \mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,05$ ), y no encontraron diferencias para el P1NP ( $167,8 \pm 5,2 \mu\text{g/L}$  y  $144 \pm 45 \mu\text{g/L}$ , N.S.). También fueron observados niveles más elevados de las citoquinas, IL-6 y TNF- $\alpha$  comparado con una población sana (278) ( $5,3 \pm 0,8 \text{ ng/L}$  vs  $1,3 \pm 0,3 \text{ ng/L}$ ,  $p < 0,05$  y  $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$  vs  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). En este trabajo, los autores sugieren que los niveles elevados de OC sérico hallados, podría tener un papel importante en el mantenimiento de una DMO lumbar normal en pacientes jóvenes con FQ. Y las citoquinas desempeñan un papel en la regulación del recambio óseo, en la inflamación crónica como puede verse en estos pacientes. Sin embargo, una limitación de este trabajo es que se aborda en un número pequeño de pacientes (N=17).

Estudios en niños y en modelos animales han sido relevantes para refutar el hecho de que la inflamación causa cambios óseos estructurales. En el trabajo anterior de Sermet et al. (252), se observaron aumentos de densidad mineral ósea más bajos en pacientes FQ con enfermedad leve y estado nutricional normal, a partir de los 6 años de edad, lo que sugiere que la CFBD puede deberse en parte a un defecto primario en el metabolismo óseo.

Por otro lado, es bien conocido que para la síntesis de OC (proteína de la matriz ósea necesaria para el depósito de calcio en ésta), se requiere la vitamina K como cofactor. Un estado subóptimo de ésta, se ha asociado con una disminución de la masa ósea y biomarcadores óseos anormales en la FQ (279,280). Aunque se ha reconocido durante mucho tiempo que la flora intestinal sintetiza la vitamina K, no está claro con qué precisión y en qué grado esto contribuye al estado de la vitamina K (281). También en estos pacientes el uso frecuente de antibióticos puede reducir la contribución de la síntesis de la flora intestinal y su contribución al grupo de

vitamina K (282). Todos nuestros pacientes FQ IP reciben una suplementación con vitamina K como parte de su tratamiento, tal como se recomienda en la guía europea de mineralización ósea en fibrosis quística (31). Por lo tanto, esto nos haría pensar en la contribución de la suplementación vitamina K sobre los niveles de OC y porqué a pesar de hallar niveles más bajos en los pacientes FQ no se muestran diferencias significativas respecto a los controles. En un estudio realizado por Nicolaidou et al. (283) se midieron los marcadores P1NP, FAO, OC, PTH y vitamina D además de la DMO en columna lumbar, en un grupo de 20 niños y adolescentes con FQ de edades entre 6 y 17 años. Estas mediciones se realizaron antes de la iniciar una suplementación con vitamina K y tras el año de la misma, además de en un grupo control formado por 25 niños y adolescentes. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron niveles significativamente más bajos de vitamina K, FAO, OC y P1NP en el grupo de pacientes antes de la toma de vitamina K frente al grupo control ( $p=0,021$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,00$ ,  $p<0,001$ ). También se observaron niveles más elevados de PTH ( $p=0,005$ ). La comparación de este grupo de pacientes al año de estar con la suplementación con vitamina K con el grupo control mostró que aunque los niveles de vitamina D, FAO y P1NP permanecieron significativamente más bajos ( $p<0,001$ ,  $p=0,001$  y  $p=0,020$ , respectivamente), no se hallaron diferencias significativas entre estos dos grupos a nivel de OC y PTH. Finalmente, la comparación entre el mismo grupo de pacientes antes y después de la suplementación con vitamina K, mostraron niveles de OC y P1NP significativamente más elevados en los pacientes al año tras la toma de vitamina K ( $p=0,005$ ,  $p<0,001$ , respectivamente) y no mostró diferencias a nivel de los Z scores de columna ( $p=0,935$ ). Estos autores indican que la suplementación con vitamina K puede tener un papel beneficioso en la salud ósea en niños con FQ.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos de MRO en función al grado de insuficiencia pancreática muestran el buen control de estos pacientes. No se observan diferencias significativas a nivel de ningún marcador excepto para la OC

## Discusión

( $p=0,001$ ), donde observamos valores más bajos en los FQ con IP. Se sabe que este tipo de pacientes presenta mayores dificultades para la absorción de vitaminas liposolubles, entre las que se encuentra la vitamina k (280,284), factor clave para la formación de OC. Adicionalmente, se hallaron asociaciones significativas y positivas entre los marcadores de recambio óseo en ambos grupos: OC vs P1NP ( $r=0,676$ , en ambos grupos), OC vs FAT y FAO ( $r=0,335$ ;  $r=0,344$ , grupo FQ) y ( $r=0,665$ ;  $r=0,678$ , grupo control), P1NP vs FAT y FAO ( $r=0,554$ ;  $r=0,539$ , grupo FQ) y ( $r=0,680$ ;  $r=0,723$ , grupo control),  $\beta$ -CrossLap vs FAT y FAO ( $r=0,483$ ;  $r=0,510$ , grupo FQ) y ( $r=0,384$ ;  $r=0,463$ , grupo control), P1NP vs  $\beta$ -CrossLap ( $r=0,553$ , grupo FQ) y ( $r=0,623$ , grupo control). IL-6 vs  $TNF\alpha$  ( $r=0,490$ , grupo control). Una correlación negativa fue vista entre la vitamina D y la PTH ( $r= -0,308$ , grupo FQ) y ( $r= -0,358$ , grupo control), al igual que para la IL-6 vs P1NP y FAT ( $r=-0,359$ ;  $r= -0,285$  en el grupo control), no siendo muchas de ellas significativas, ya que los marcadores del metabolismo óseo reflejan diferentes procesos biológicos durante el crecimiento del esqueleto. Estos marcadores se liberan durante las diferentes etapas de la formación o resorción ósea.

Greer R et al. (261) realizaron un estudio en 149 pacientes FQ (81 sexo masculino) y 141 controles (61 sexo masculino) que comprendían a niños con rango de edad 5,3 - 10,99 años, adolescentes de 11 - 17,99 años y adultos de 18 - 55,9 años. Se midieron niveles de OC, Calcio, PTH, magnesio, 25 OH vitamina D y 1,25 OH vitamina D. Y sus resultados no mostraron diferencias significativas a nivel de la OC en niños y adolescente FQ vs control ( $p=0,71$  y  $p=0,15$ , respectivamente), al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas en el grupo de adultos vs control con una  $p=0,005$ . A nivel de la PTH también se observaron diferencias significativas entre grupos ( $p <0.0001$ ), con niveles por debajo, dentro y por encima del rango de control. Sin embargo no hubo diferencias en la PTH general entre los controles y pacientes FQ (mediana 3,05 vs 3,0 nmol/L,

$p=0,94$ ). La 25 OH vitamina D no fue diferente en el control y los pacientes FQ ( $p=0.06$ ). Y la 1,25 OH vitamina D fue menor en el grupo con FQ ( $p<0,0001$ ), no explicada por 25 OH vitamina D o la gravedad de la enfermedad, como lo fue el magnesio sérico ( $p<0,0001$ ), al igual que lo observado en nuestro estudio, aunque en nuestro caso los niveles de magnesio no fueron determinados. En un análisis de regresión múltiple, estos autores investigaron potenciales predictores para la 1,25 OH vitamina D. La 25 OH vitamina D, el magnesio, la PTH y la interacción entre PTH y estado control, fueron significativos predictores y se encontró una diferente relación entre PTH y 1,25 OH vitamina D en el grupo control y sujetos con FQ. El incremento de PTH fue asociado con el incremento de 1,25 OH vitamina D en sujetos control pero no en sujetos con FQ, indicando que los sujetos con FQ fueron relativamente resistentes al efecto estimulador de la PTH sobre la 1,25 OH vitamina D.

Los autores concluyeron que a pesar de observar niveles suficientes de vitamina D, fueron vistas anormalidades en el metabolismo del calcio (en todos los grupos de edad) y en los marcadores de recambio óseo (en adolescentes y adultos), no explicados completamente por la función pulmonar, el genotipo o el estatus pancreático. Sugieren que los niveles de 1,25 OH vitamina D relativamente bajos, aunque no subóptimos, concurrentes con niveles normales de 25 vitamina D, probablemente no sean causados por la deficiencia de sustrato, pero estarían relacionados con una actividad renal funcional disminuida de la  $1\alpha$ -hidroxilasa (posiblemente relacionada con CFTR), y/o aumento del consumo de la 1,25 OH vitamina D.

Otro punto importante a abordar sería el efecto de los lípidos sobre la fisiología ósea. La evidencia creciente destaca las acciones locales de los lípidos a este nivel (285). La disfunción CFTR causa anomalías en el metabolismo de los esfingolípidos (286,287), y se ha observado una disminución del nivel de esfingosina-1-fosfato

(S1P) en la enfermedad pulmonar en FQ (288,289). S1P es un mediador de lípidos bioactivos bien conocido, que desempeña funciones importantes en muchos procesos de reparación de tejidos, incluida la regeneración ósea y el crecimiento de tejido óseo in vivo (290). S1P facilita la migración de los precursores de osteoclastos desde el hueso a la sangre a través de la acción del receptor S1PR1. Sin embargo, el receptor S1PR2, media el efecto reverso, resultando en un cambio en la dirección de los precursores de los osteoclastos desde la sangre al hueso. Se ha visto que la 1,25 OH vitamina D, actúa a nivel de S1PR2, inhibiendo la generación de osteoclastos y resorción ósea. En nuestro estudio, los niveles de 1,25 OH vitamina D en FQ fueron más bajos respecto a los controles, mostrando diferencias significativas, lo que nos haría pensar que estos niveles disminuidos podrían resultar en un aumento de la resorción ósea como se observa en nuestros pacientes. Por otro lado, S1P activa la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y, por lo tanto, induce la expresión de OPG en líneas celulares osteoblásticas (291). Datos recientes destacan un papel importante de S1P en la actividad de las células óseas al aumentar la producción PGE<sub>2</sub>, reduciendo la expresión de la relación RANKL/OPG y mejorando la formación ósea. Aunque el papel de S1P en el proceso de remodelación ósea es sugestivo, debe ser explorado en el desarrollo de CFBD y en el contexto de otras acciones de S1P, como el mecanismo de señalización en las acciones de varias citoquinas, factores de crecimiento y hormonas (292). Entre estos se ha informado de una interacción con la vitamina D, ya que se ha encontrado que la inhibición de la apoptosis por 1,25 OH vitamina D en células HL60 (293) y queratinocitos (294) mediada por la S1P; quizás exista un papel antiapoptótico similar para la S1P en los osteoblastos. Por lo tanto, es tentador especular que el CFTR también podría estar involucrado en la señalización de S1P en las células óseas, lo que explicaría algunas de las actividades aberrantes observadas en los osteoblastos deficientes en CFTR.

Es conocido que remodelación ósea y la inflamación contribuyen significativamente a la patogenia de la CFBD, pero hasta la fecha los estudios y el descubrimiento de fármacos se han centrado en objetivos inflamatorios. Aunque han surgido terapias novedosas, como la mejora de la función pulmonar y la inflamación, es evidente que la inflamación por sí sola no ha permitido mejorar la enfermedad ósea. Por lo tanto, sugerimos que para hacer un cambio gradual en la terapia con CFBD, el enfoque de la investigación debería investigar los mecanismos que subyacen al acoplamiento de las actividades de formación y reabsorción ósea, y los enfoques.

Nuestro estudio está sujeto a la limitación de usar DEXA como un método para medir la DMO. El aumento en el tamaño del hueso da como resultado una mayor DMO del área medida por DEXA, y a la inversa, incluso cuando la verdadera DMO volumétrica sigue siendo la misma, y se sabe que la altura suele ser menor en pacientes con FQ en comparación con la población general. En consecuencia, nuestro estudio puede haber sobreestimado el grado de disminución de la masa ósea en pacientes con FQ.

Aunque existe conciencia del problema de los efectos del tamaño en la densitometría ósea, todavía no existe un consenso sobre la forma más adecuada de corregir los resultados para el tamaño y expresarlos.





# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

---

1. La DMO de columna lumbar en niños con FQ es inferior a la de niños sin enfermedad. Concretamente, en el sexo masculino hemos encontrado diferencias significativas entre los valores de DMO de columna del grupo FQ de 6-10 años de edad respecto a la población madrileña ( $p=0,001$ ) y respecto a la población catalana ( $p<0,001$ ). En el caso del sexo femenino, las diferencias fueron observadas en el grupo de FQ > 10 años de edad respecto a la población madrileña ( $p=0,036$ ) y a la población catalana ( $p<0,001$ ).

2. Hemos encontrado 3 pacientes con Z scores de columna  $<-2$  DE respecto a la cohorte madrileña (6,38 %), y 4 pacientes con Z scores de columna  $<-2$  DE respecto a la cohorte catalana (8,51 %). Los Z scores calculados en función de del sexo y grupos de edad muestran valores por debajo de la media en la totalidad del sexo masculino respecto a la población catalana y en la mayoría de los grupos de edad respecto a la población madrileña, salvo las edades de 6, 7, 14 y 16 años. En el caso del sexo femenino, respecto a la población madrileña, los Z scores por debajo de la media se ven en las edades de 6, 7, 12, 13 y 14 años y en la población catalana, la mayoría se hallan por debajo, salvo las edades de 9, 10 y 11 años.

3. No se observaron diferencias entre los Z scores de columna en los pacientes FQ en función del grado de insuficiencia pancreática.

4. Existe una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ) entre la DMO de columna lumbar con la DMO de columna sectorial, siendo la DMO de L3 la que posee una relación más fuerte (coeficiente de correlación de Pearson = 0,990).

5. Existe una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ), entre la DMO total de columna lumbar y DMO de columna sectorial con la edad, la talla, el peso y el IMC.

6. Hemos encontrado valores medios más elevados de DMO de columna total y sectorial en niñas que en niños, no observándose diferencias significativas entre sexo.

7. Hemos observado dentro del grupo de pacientes FQ, que las variables, edad, género, IMC, PTH,  $\beta$ -CrossLap y OPG explican el 87% de la variabilidad de la DMO de columna total.

8. Como técnica de estudio de la DMO consideramos la realización de la densitometría mediante DEXA por ser una técnica sencilla, rápida y reproducible y con escasa radiación.

9. Se observan valores medios más bajos en todos los marcadores de formación ósea en niños con FQ, siendo estadísticamente significativos para FAO y OPG ( $p=0,040$  y  $p<0,001$ ), respectivamente y esto puede contribuir al desequilibrio del turnover óseo. De igual manera pueden hacerlo los niveles más elevados de la mayoría de los marcadores de resorción ósea hallados en el grupo de pacientes FQ, siendo en este caso significativos, PTH,  $\beta$ -CrossLap y 1,25 OH vitamina D ( $p=0,005$ ,  $p=0,004$  y  $p<0,001$ ) respectivamente. También hallamos valores más elevados del biomarcador de inflamación TNF- $\alpha$  en los niños con FQ, siendo significativo ( $p<0,001$ ) que contribuye a la resorción ósea y valores disminuidos de calcio respecto al control con  $p<0,001$ . Los datos demuestran una degradación ósea acelerada sin un aumento compensatorio en la formación ósea pacientes FQ clínicamente estables. Además de ver que el desequilibrio entre el proceso de formación y resorción ósea puede aparecer en edades tempranas.

10. Se hallaron asociaciones significativas y positivas entre los marcadores de recambio óseo en los pacientes y el grupo control, lo que sugiere una respuesta paralela a la pubertad de los marcadores de formación y reabsorción.

## Conclusiones

11. Se observó que los niveles de calcio, 1,25 OH Vitamina D y OPG son protectores de presentar enfermedad ósea, a la inversa que lo mostrado para los parámetros TNF- $\alpha$  y PTH que su aumento eleva el riesgo de producirla.

12. Dado los resultados obtenidos de baja densidad mineral ósea en la muestra de pacientes FQ, así como el desequilibrio observado en el turnover óseo, se podría sugerir la realización de un screening de este defecto en las poblaciones con FQ mediante cuantificación de marcadores de remodelado óseo y la realización sistemática de densitometría, teniendo en cuenta el historial de fracturas de bajo trauma y factores de riesgo, así como situaciones especiales que requieran de la monitorización de la respuesta tras una intervención farmacológica. Un niño puede actuar apropiadamente como su propio control, con exploraciones en serie para monitorear el progreso. Este enfoque nos permitirá estar en una mejor posición para definir los grupos de niños que se benefician más de la investigación.

13. Definir el estado mineral óseo en esta población podría proporcionar una nueva perspectiva de la patogénesis subyacente de los déficits de DMO en la FQ, identificar la edad de inicio y ayudar a optimizar las estrategias de tratamiento preventivo durante este período crítico de desarrollo.



# BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Castellani C, Macek M, Cassiman J-J, Duff A, Massie J, ten Kate LP, et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* mayo de 2010;9(3):165-78.
2. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Mechanisms of Disease Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 12 de mayo de 2005;352(19):1992-2001.
3. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de octubre de 2003;168(8):918-51.
4. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science.* 8 de mayo de 1992;256(5058):774-9.
5. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 22 de febrero de 2003;361(9358):681-9.
6. Robinson P. Cystic fibrosis. *Thorax.* marzo de 2001;56(3):237-41.
7. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* enero de 1999;79(1 Suppl):S3-22.
8. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 2 de julio de 1993;73(7):1251-4.
9. Máiza, L., Barandab, F., Coll, R., Prados, C., Vendrell, M., Escribano, A., et al. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria de la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol.* 13 de junio de 2001;37:316-24.
10. Padilla A, Olveira G, Olveira C, Dorado A, Plata AJ, Gaspar I, et al. [Validity and reliability of the St George's Respiratory Questionnaire in adults with cystic fibrosis]. *Arch Bronconeumol.* abril de 2007;43(4):205-11.
11. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiol Bethesda Md.* junio de 2007;22:212-25.
12. Madge S, Khair K. Multidisciplinary teams in the United Kingdom: problems and solutions. *J Pediatr Nurs.* abril de 2000;15(2):131-4.
13. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* marzo de 1959;23(3):545-9.
14. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet Lond Engl.* 3 de marzo de 1979;1(8114):472-4.
15. Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* marzo de 1995;151(3 Pt 2):S47-53.

16. Óscar Fielbaum C. Avances en fibrosis quística. Rev Médica Clínica Las Condes. 1 de marzo de 2011;22(2):150-9.
17. Cystic Fibrosis Mutation Database. (consultado 15 May 2017). Disponible en: [www.genetic.sickkids.on.ca](http://www.genetic.sickkids.on.ca).
18. Quintana-Gallego E, Delgado-Pecellín I, Calero Acuña C. Tratamientos reparadores de la proteína CFTR en la fibrosis quística. Arch Bronconeumol. 1 de abril de 2014;50(4):146-50.
19. Zeitlin PL. Pharmacologic restoration of  $\Delta F508$  CFTR-mediated chloride current. Kidney Int. 1 de marzo de 2000;57(3):832-7.
20. Rebecca K. Rowntree and Ann Harris. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. ResearchGate. 2003;67:471-85.
21. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J-J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. marzo de 2002;1(1):13-29.
22. Jilling T, Kirk KL. The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Int Rev Cytol. 1997;172:193-241.
23. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev. enero de 1999;79(1 Suppl):S23-45.
24. Casals T, Ramos MD, Giménez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. Hum Genet. diciembre de 1997;101(3):365-70.
25. Dörk T, Macek M, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. Hum Genet. marzo de 2000;106(3):259-68.
26. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. Lancet Respir Med. agosto de 2016;4(8):662-74.
27. Dapaena Fernández FJ, Ramos Mayo C, Gómez de Terreros I. Actualización terapéutica en la fibrosis quística. Vol. 27. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud; 2003. 129-144 p.
28. Coakley RD, Grubb BR, Paradiso AM, Gatzky JT, Johnson LG, Kreda SM, et al. Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 de diciembre de 2003;100(26):16083-8.
29. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. Nature. 1 de marzo de 2001;410(6824):94-7.
30. Daftary A, Acton J, Heubi J, Amin R. Fecal elastase-1: utility in pancreatic function in cystic fibrosis. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. mayo de 2006;5(2):71-6.

## Bibliografía

31. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, et al. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* junio de 2011;10 Suppl 2:S16-23.
32. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, et al. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo de 2005;90(3):1888-96.
33. Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, McKeon DJ, Scott MA,, Compston JE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax.* 2007;62:650-1.
34. Saggese G, Vierucci F, Boot AM, Czech-Kowalska J, Weber G, Camargo CA, et al. Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement. *Eur J Pediatr.* mayo de 2015;174(5):565-76.
35. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, Fewtrell M, El-Hajj Fuleihan G, Kecskemethy HH, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* junio de 2014;17(2):225-42.
36. Weiser G, Kerem E. Early intervention in CF: how to monitor the effect. *Pediatr Pulmonol.* noviembre de 2007;42(11):1002-7.
37. World Health Organization. Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a Joint Working Group of WHO/ICF(M) A/ECFS/ECFTN, 2001 (reprinted in: *J Cyst Fibros.* 2002;1:5-8).
38. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr.* agosto de 2008;153(2):S4-14.
39. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* febrero de 2017;181S:S4-S15.e1.
40. Parad RB, Comeau AM. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr.* septiembre de 2005;147(3):S78-82.
41. Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* mayo de 2014;13 Suppl 1:S3-22.
42. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, Wolfe S, Steinkamp G, Heijerman HGM, et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* junio de 2002;1(2):51-75.
43. Borowitz D, Baker RD, Stallings V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* septiembre de 2002;35(3):246-59.

44. Oliveira Fuster C, Oliveira Fuster G, Dorado Galindo A, Padilla Galo A, Merino Verdugo J, Miralles Lozano F. Estudio del gasto energético en adultos con fibrosis quística: concordancia entre la calorimetría indirecta y diversas fórmulas estimativas. Arch Bronconeumol. 1 de julio de 2007;43(7):366-72.
45. Ramsey BW, Farrell PM, Pencharz P. Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. The Consensus Committee. Am J Clin Nutr. enero de 1992;55(1):108-16.
46. Oliveira Fuster G, Laínez López M. Importancia del soporte nutricional en adultos con fibrosis quística. Endocrinol Nutr. :326-34.
47. Maqbool A, Stallings VA. Update on fat-soluble vitamins in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med. noviembre de 2008;14(6):574-81.
48. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc. 1 de marzo de 2013;22(127):58-65.
49. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, Miguel Angel Alobera Gracia, Miguel Angel Alobera Gracia, Luis Blanco Jerez. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal. 2006;11:E151-7.
50. Roland EB. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Murray JF, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 3ª. New York: Lippincott-Raven publishers; 1996. 3-10 p.
51. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. Metab Bone Dis Relat Res. 1982;4(1):1-6.
52. Compston JE. Sex steroids and bone. Physiol Rev. enero de 2001;81(1):419-47.
53. Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Søballe K, Eriksen EF, Bünger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. febrero de 1995;103(2):140-6.
54. Arboleya L, Castañeda S. Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. Reumatol Clínica. 1 de septiembre de 2013;9(5):303-15.
55. Grant SFA, Ralston SH. Genes and osteoporosis. Trends Endocrinol Metab. 1 de agosto de 1997;8(6):232-6.
56. Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. Science. 22 de septiembre de 1978;201(4361):1138-41.
57. Trueta J. The role of the vessels in osteogenesis. Bone Jt J. 1963;45(2):402-418.
58. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. J Bone Joint Surg Am. julio de 1952;24 A(3):701-28.

## Bibliografía

59. M. Alonso Franch MPRdR. Nutrición y enfermedad ósea en la infancia. In: Gil A, editor. Tratado de nutrición clínica. IV. Madrid: Panamericana; 2010. 813-33 p.
60. Wojcicka A, Bassett JHD, Williams GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2013;1830(7):3979-86.
61. Waung JA, Bassett JHD, Williams GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab TEM*. abril de 2012;23(4):155-62.
62. Gogakos AI, Duncan Bassett JH, Williams GR. Thyroid and bone. *Arch Biochem Biophys*. 1 de noviembre de 2010;503(1):129-36.
63. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am*. diciembre de 1989;18(4):903-18.
64. Wener JA, Gorton SJ, Raisz LG. Escape from inhibition or resorption in cultures of fetal bone treated with calcitonin and parathyroid hormone. *Endocrinology*. marzo de 1972;90(3):752-9.
65. McSheehy PM, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology*. febrero de 1986;118(2):824-8.
66. Raisz LG. Bone cell biology: new approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. diciembre de 1993;8 Suppl 2:S457-465.
67. Albiach V.J. El crecimiento: Regulación del crecimiento posnatal. En: Audí L, Bueno M y Calzada R. editores. En: Tratado de endocrinología pediátrica. 4ª. Madrid: McGraw-Hill España; 2009. p. 145-51.
68. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*. 2005;64(4):157-65.
69. Root AW, Diamond FB. Overgrowth syndromes: evaluation and management of child with excessive linear growth. En: *Pediatric endocrinology*. 5ª. New York: Fima Lifshitz; 2007. p. 163-94.
70. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. septiembre de 1999;140(9):4367-70.
71. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Minireview: Osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol*. 2011;24:877-85.
72. Chen H, Guo JH, Lu YC, Ding GL, Yu MK, Tsang LL, et al. Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. marzo de 2012;97(3):923-32.

73. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* abril de 2000;21(2):115-37.
74. Tanaka Y. [Glucocorticoid and Bone. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis]. *Clin Calcium.* septiembre de 2014;24(9):1289-94.
75. Soen S. [Glucocorticoid and bone]. *Clin Calcium.* junio de 2014;24(6):829-36.
76. Harvey S, Hull KL. Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine.* diciembre de 1997;7(3):267-79.
77. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:131-53.
78. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, et al. Osteoblast-specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization. *J Biol Chem.* 15 de noviembre de 2002;277(46):44005-12.
79. Switzer M, Rice J, Rice M, Hardin DS. Insulin-like Growth Factor-I Levels Predict Weight, Height and Protein Catabolism in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;22(5):417–424.
80. Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, et al. Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de noviembre de 2010;107(47):20571-5.
81. Gronowicz GA, McCarthy M-B, Zhang H, Zhang W. Insulin-like growth factor II induces apoptosis in osteoblasts. *Bone.* septiembre de 2004;35(3):621-8.
82. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* diciembre de 1993;8 Suppl 2:S565-572.
83. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* agosto de 2000;21(4):393-411.
84. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* abril de 2003;24(2):218-35.
85. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* abril de 1994;15(2):203-8.
86. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene.* 16 de octubre de 2003;316:23-32.
87. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol.* 2016;18:9-16.
88. Karmakar S, Kay J, Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am.* mayo de 2010;36(2):385-404.

## Bibliografía

89. Young MF. Bone Matrix Proteins: More Than Markers. *Calcif Tissue Int.* 1 de enero de 2003;72(1):2-4.
90. Horowitz M. Matrix Proteins versus Cytokines in the Regulation of Osteoblast Function and Bone Formation. *Calcif Tissue Int.* 1 de enero de 2003;72(1):5-7.
91. Nagai H, Tsukuda R, Mayahara H. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone formation in growing rats. *Bone.* 1 de marzo de 1995;16(3):367-73.
92. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de septiembre de 2002;169(6):3353-62.
93. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 2 de febrero de 1995;332(5):305-11.
94. Martin TJ, Romas E, Gillespie MT. Interleukins in the control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1998;8(2):107-23.
95. Roodman GD. Studies in Paget's disease and their relevance to oncology. *Semin Oncol.* agosto de 2001;28(4 Suppl 11):15-21.
96. Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, et al. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood.* 1 de septiembre de 1991;78(5):1198-204.
97. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* enero de 1996;11(1):88-95.
98. Grey A, Mitnick MA, Shapses S, Ellison A, Gundberg C, Insogna K. Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* octubre de 1996;81(10):3450-4.
99. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, et al. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest.* marzo de 1992;89(3):883-91.
100. Haworth CS. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med.* noviembre de 2010;16(6):616-22.
101. Bell SC, Bowerman AM, Nixon LE, Macdonald IA, Elborn JS, Shale DJ. Metabolic and inflammatory responses to pulmonary exacerbation in adults with cystic fibrosis. *Eur J Clin Invest.* junio de 2000;30(6):553-9.

102. Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Martin L, Elborn JS, Sharples LD, et al. Inflammatory related changes in bone mineral content in adults with cystic fibrosis. *Thorax*. julio de 2004;59(7):613-7.
103. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res*. 2002;4(Suppl 3):S227-32.
104. Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, Aubin JE, Maeda N. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone*. 1 de junio de 2009;44(6):1177-85.
105. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. abril de 2008;29(2):155-92.
106. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 1 de marzo de 2009;2(1):56-64.
107. Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. junio de 1999;4(6):353-62.
108. Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol*. mayo de 2010;42(5):576-9.
109. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab*. noviembre de 2014;21(4):233-41.
110. Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clínica*. 1 de septiembre de 2011;7:1-4.
111. Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(2):128-37.
112. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*. diciembre de 2005;208:50-65.
113. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014;5:511.
114. Soysa NS, Alles N, Aoki K, Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci*. 8 de noviembre de 2012;59(3):65-74.
115. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med Berl Ger*. marzo de 2005;83(3):170-9.
116. Seeling M, Hillen hoff U, David JP, Schett G, Tuckermann J, Lux A, et al. Inflammatory monocytes and Fcγ receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de junio de 2013;110(26):10729-34.

## Bibliografía

117. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* diciembre de 2011;112(12):3491-501.
118. Javed A, Chen H, Ghori FY. Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am.* agosto de 2010;22(3):283-93.
119. Chau JFL, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol.* 2009;24(12):1593-606.
120. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1325-44.
121. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci.* 1 de abril de 2011;124(Pt 7):991-8.
122. Yang Y-Q, Tan Y-Y, Wong R, Wenden A, Zhang L-K, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* junio de 2012;4(2):64-8.
123. Torres E, Mezquita P, De La Higuera M, Fernández D, Muñoz M. Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. *Endocrinol Nutr.* :237-43.
124. Ebeling PR, Akesson K. Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* julio de 2001;15(3):385-400.
125. Kemp JP, Sayers A, Paternoster L, Evans DM, Deere K, St Pourcain B, et al. Does bone resorption stimulate periosteal expansion? A cross-sectional analysis of  $\beta$ -C-telopeptides of type I collagen (CTX), genetic markers of the RANKL pathway, and periosteal circumference as measured by pQCT. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* abril de 2014;29(4):1015-24.
126. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* diciembre de 2008;19(12):1683-704.
127. Camacho P, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. En: Murray J. Favus, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6<sup>a</sup>. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. 127-33 p.
128. Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: Utilidad clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* junio de 2009;43(2):177-93.
129. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science.* 19 de enero de 1996;271(5247):360-2.
130. Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Turnover Part II: Clinical Applications in the Management of Osteoporosis. *Clin Biochem Rev.* agosto de 2006;27(3):123-38.

131. Mora S, Cafarelli L, Erba P, Puzzovio M, Zamproni I, Giacomet V, et al. Differential effect of age, gender and puberty on bone formation rate assessed by measurement of bone-specific alkaline phosphatase in healthy Italian children and adolescents. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):721-6.
132. Léger J, Mercat I, Alberti C, Chevenne D, Armoogum P, Tichet J, et al. The relationship between the GH/IGF-I axis and serum markers of bone turnover metabolism in healthy children. *Eur J Endocrinol.* noviembre de 2007;157(5):685-92.
133. Ji F, Fu S-J, Guo Z-Y, Pang H, Ju W-Q, Wang D-P, et al. Prognostic value of combined preoperative lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase levels in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medicine (Baltimore).* julio de 2016;95(27):e4065.
134. Orsaria M, Londero AP, Marzinotto S, Di Loreto C, Marchesoni D, Mariuzzi L. Placental type alkaline phosphatase tissue expression in ovarian serous carcinoma. *Cancer Biomark Sect Dis Markers.* 2016;17(4):479-86.
135. Yang L, Grey V. Pediatric reference intervals for bone markers. *Clin Biochem.* junio de 2006;39(6):561-8.
136. Jamal SA, Leiter RE, Bayoumi AM, Bauer DC, Cummings SR. Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1 de mayo de 2005;16(5):534-40.
137. Ferrer Cañabate J, Tovar I, Martínez P. Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo? En: *Anales de Medicina Interna [Internet]. SciELO Espana; 2002 [citado 17 de septiembre de 2017].* p. 5–8. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992002000800001](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992002000800001)
138. Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En: Davis JE ed. *Bone Engineering.* Toronto: Davis JE; 2000. 19-30 p.
139. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):2–12.
140. McLean W, Olsen BR. Mouse models of abnormal skeletal development and homeostasis. *TRENDS Genet.* 2001;17(10):S38–S43.
141. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1 de mayo de 1998;12(9):1260-8.
142. Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem.* noviembre de 2005;26(4):97-122.
143. Khosla S, Kleerekoper M. In: Favus MJ editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 5ª. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2003.

## Bibliografía

144. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Beertsen W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. septiembre de 1998;13(9):1420-30.
145. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 15 de marzo de 2004;199(6):805-14.
146. Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Wilson JM, Baumgartner RN. Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem*. noviembre de 2001;34(8):639-44.
147. De la Piedra C, Díaz Martín MA, Díaz Diego EM, Rapado A. Correlación entre el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I y la densidad mineral ósea medida por DEXA en la osteoporosis postmenopáusica. *REEMO*. 1992;1 (Supl B):30.
148. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2000;11 Suppl 6:S18-29.
149. Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mol Diagn Ther*. 2008;12(3):157-70.
150. Herrmann M, Seibel MJ, Seibel M. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 17 de julio de 2008;393(2):57-75.
151. Navarro Casado L, Cabrera B, Antonio J, Montes P, Del J, Almar Marqués E, et al. Utilidad clínica de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo en la mujer posmenopáusica reciente: estudio longitudinal a 2 años. *Med Clínica*. :333-8.
152. Carrascosa A, Del RL, Gussiny. M, Yeste D, Aud. L. Mineralización del esqueleto óseo durante la infancia y adolescencia. Factores reguladores y patrones de normalidad. *An Esp Pediatr*. 1994;40:246-52.
153. van der SIM, de MK-SSMPF. Osteoporosis in Childhood: Bone Density of Children in Health and Disease. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2011;14(7):817–832.
154. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 14 de febrero de 2001;285(6):785-95.
155. Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Lewiecki EM, et al. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom*. marzo de 2008;11(1):75-91.
156. The Section on Endocrinology. Bone Densitometry in Children and Adolescents. *PEDIATRICS*. 1 de enero de 2011;127(1):189-94.

157. Rauch F, Plotkin H, DiMeglio L, Engelbert RH, Henderson RC, Munns C, et al. Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2007 Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* marzo de 2008;11(1):22-8.
158. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex- and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. *J Clin Endocrinol Metab.* febrero de 2007;92(2):443-9.
159. Szulc P, Kaufman JM, Delmas PD. Biochemical assessment of bone turnover and bone fragility in men. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* noviembre de 2007;18(11):1451-61.
160. Shaw NJ. Management of osteoporosis in children. *Eur J Endocrinol.* diciembre de 2008;159 Suppl 1:S33-39.
161. Bogunovic L, Doyle SM, Vogiatzi MG. Measurement of bone density in the pediatric population. *Curr Opin Pediatr.* febrero de 2009;21(1):77-82.
162. Oury F. A crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci.* julio de 2012;1260:1-7.
163. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Puberty and bone development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* marzo de 2002;16(1):53-64.
164. Karsenty G. The mutual dependence between bone and gonads. *J Endocrinol.* 5 de enero de 2012;213(2):107-14.
165. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2000;11(4):281-94.
166. Gracia-Marco L, Ortega FB, Jiménez-Pavón D, Rodríguez G, Valtueña J, Díaz-Martínez AE, et al. Contribution of bone turnover markers to bone mass in pubertal boys and girls. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM.* 2011;24(11-12):971-4.
167. Yilmaz D, Ersoy B, Bilgin E, Gümüşer G, Onur E, Pinar ED. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(6):476-82.
168. Lehtonen-Veromaa M, Möttönen T, Irjala K, Nuotio I, Leino A, Viikari J. A 1-year prospective study on the relationship between physical activity, markers of bone metabolism, and bone acquisition in peripubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(10):3726–3732.
169. Flemming GMC, Petzold S, Meigen C, Körner A, Kiess W, Kratzsch J. Is circulating osteocalcin related to adipokines and overweight/obesity in children and adolescents? *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* julio de 2012;120(7):383-7.

## Bibliografía

170. Fares JE, Choucair M, Nabulsi M, Salamoun M, Shahine CH, Fuleihan GE-H. Effect of gender, puberty, and vitamin D status on biochemical markers of bone remodeling. *Bone*. agosto de 2003;33(2):242-7.
171. Atkinson SA. Vitamin D status and bone biomarkers in childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer*. febrero de 2008;50(2 Suppl):479-82; discussion 486.
172. Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(2):221-58.
173. Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In: Riggs BL, Melton LJ, editors. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995:319–33.
174. Pittard WB, Geddes KM, Hulsey TC, Hollis BW. Osteocalcin, skeletal alkaline phosphatase, and bone mineral content in very low birth weight infants: a longitudinal assessment. *Pediatr Res*. febrero de 1992;31(2):181-5.
175. Magnusson P, Häger A, Larsson L. Serum osteocalcin and bone and liver alkaline phosphatase isoforms in healthy children and adolescents. *Pediatr Res*. diciembre de 1995;38(6):955-61.
176. Tobiume H, Kanzaki S, Hida S, Ono T, Moriwake T, Yamauchi S, et al. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. julio de 1997;82(7):2056-61.
177. Blumsohn A, Hannon RA, Wrate R, Barton J, al-Dehaimi AW, Colwell A, et al. Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. mayo de 1994;40(5):663-70.
178. Gennai I, Di Iorgi N, Reggiardo G, Gatti C, Bertelli E, Allegri AEM, et al. Age- and sex-matched reference curves for serum collagen type I C-telopeptides and bone alkaline phosphatase in children and adolescents: An alternative multivariate statistical analysis approach. *Clin Biochem*. julio de 2016;49(10-11):802-7.
179. Gracia-Marco L, Vicente-Rodríguez G, Valtueña J, Rey-López JP, Díaz Martínez AE, Mesana MI, et al. Bone mass and bone metabolism markers during adolescence: The HELENA Study. *Horm Res Paediatr*. 2010;74(5):339-50.
180. Marazuela M, Astigarraga B, J Tabuenca M, Estrada J, Marin F, Lucas T. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. *Calcif Tissue Int*. 1 de julio de 1993;52:419-21.
181. van Coeverden SCCM, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. julio de 2002;57(1):107-16.
182. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):796-809.

183. Delemarre-van de Waal HA, van Coeverden SC, Rotteveel J. Hormonal determinants of pubertal growth. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2001;14 Suppl 6:1521-6.
184. Buzi F, Maccarinelli G, Guaragni B, Ruggeri F, Radetti G, Meini A, et al. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factors  $\kappa$ B (RANKL) concentrations in normal children and in children with pubertal precocity, Turner's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. enero de 2004;60(1):87-91.
185. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, Pedersen BJ, Bonde M, Qvist P, et al. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem*. 1 de noviembre de 1998;44(11):2281-9.
186. DeBoer MD, Weber DR, Zemel BS, Denburg MR, Herskovitz R, Long J, et al. Bone Mineral Accrual Is Associated With Parathyroid Hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Children and Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. octubre de 2015;100(10):3814-21.
187. Zamora SA, Rizzoli R, Belli DC, Slosman DO, Bonjour JP. Vitamin D supplementation during infancy is associated with higher bone mineral mass in prepubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab*. diciembre de 1999;84(12):4541-4.
188. Lorente Ramos RM, Azpeitia Armán J, Arévalo Galeano N, Muñoz Hernández A, García Gómez JM, Gredilla Molinero J. Absorciometría con rayos X de doble energía. *Fundamentos, metodología y aplicaciones clínicas. Radiología*. septiembre de 2012;54(5):410-23.
189. Sawyer A, Moore S, Fielding KT, Nix DA, Kiratli J, Bachrach LK. Calcaneus Ultrasound Measurements in a Convenience Sample of Healthy Youth. *J Clin Densitom*. 1 de junio de 2001;4(2):111-20.
190. Sundberg M, Gärdsell P, Johnell O, Ornstein E, Sernbo I. Comparison of quantitative ultrasound measurements in calcaneus with DXA and SXA at other skeletal sites: a population-based study on 280 children aged 11-16 years. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 1998;8(5):410-7.
191. Mora S, Bachrach L, Gilsanz V. Non invasive techniques for bone mass measurement. In: Glorieux FH, Pettifor JM, Juppner H, editors. *Pediatric bone: biology and diseases*. San Diego, California: Academic Press; 2003. 303-24 p.
192. Gilsanz V, Boechat MI, Roe TF, Loro ML, Sayre JW, Goodman WG. Gender differences in vertebral body sizes in children and adolescents. *Radiology*. marzo de 1994;190(3):673-7.
193. Bachrach LK. Osteoporosis and measurement of bone mass in children and adolescents. *Endocrinol Metab Clin North Am*. septiembre de 2005;34(3):521-35, vii.
194. Halton J, Gaboury I, Grant R, Alos N, Cummings EA, Matzinger M, et al. Advanced vertebral fracture among newly diagnosed children with acute

## Bibliografía

- lymphoblastic leukemia: results of the Canadian Steroid-Associated Osteoporosis in the Pediatric Population (STOPP) research program. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* julio de 2009;24(7):1326-34.
195. Alos N, Grant RM, Ramsay T, Halton J, Cummings EA, Miettunen PM, et al. High Incidence of Vertebral Fractures in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia 12 Months After the Initiation of Therapy. *J Clin Oncol.* agosto de 2012;30(22):2760-7.
  196. Ben Amor IM, Roughley P, Glorieux FH, Rauch F. Skeletal clinical characteristics of osteogenesis imperfecta caused by haploinsufficiency mutations in COL1A1. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* septiembre de 2013;28(9):2001-7.
  197. Henderson RC, Berglund LM, May R, Zemel BS, Grossberg RI, Johnson J, et al. The relationship between fractures and DXA measures of BMD in the distal femur of children and adolescents with cerebral palsy or muscular dystrophy. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* marzo de 2010;25(3):520-6.
  198. Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO, Crabtree N, El-Hajj Fuleihan G, Kutilek S, et al. Dual energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the 2007 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* marzo de 2008;11(1):43-58.
  199. Hailey D, Marshall D, Colom L S, Granados A, R R, Asua J. "Efectividad de la medida de densidad ósea y de los tratamientos asociados en la prevención de fracturas". Proyecto conjunto INAHTA. Hailey D. (AHFMR), Marshall D. (SBU), Sampietro L., Granados A. (AATM), Rico R., Asua J. (Osteba), Sheldon T. (NHS-CRD). Septiembre 1996. 1996.
  200. Gómez-Alonso C. Díaz-López J.B. Métodos de determinación de la densidad mineral ósea. *Rev Clin Esp.* 2009;209 Supl 1:15-22.
  201. Faulkner KG, von Stetten E, Miller P. Discordance in patient classification using T-scores. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* 1999;2(3):343-50.
  202. Price RI, Retallack RW, Walters MJ, Henderson NK, Gutteridge, DH, Sikorski JM, Senior J, Kerr D, Henzell S, Kent GN. Defining osteoporotic populations using bone densitometry: Impact of different T-score thresholds. *J Bone Miner Res.* 1999;14(S:201).
  203. Bachrach LK, Sills IN, Section on Endocrinology. Clinical report—bone densitometry in children and adolescents. *Pediatrics.* enero de 2011;127(1):189-94.
  204. Pitukcheewanont P, Chen P. Bone density measurement--a systematic review. A report from SBU, the Swedish Council on Technology Assessment in Health Care. *J Intern Med Suppl.* 1997;739:1-60.
  205. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 18 de mayo de 1996;312(7041):1254-9.

206. Cranney A, Jamal SA, Tsang JF, Josse RG, Leslie WD. Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 11 de septiembre de 2007;177(6):575-80.
207. Steelman J, Zeitler P. Osteoporosis in Pediatrics. *Pediatrics in Review.* 2001;22(2):56-64.
208. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* junio de 1993;94(6):646-50.
209. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129.
210. Bishop N, Arundel P, Clark E, Dimitri P, Farr J, Jones G, et al. Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2013 Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* junio de 2014;17(2):275-80.
211. Bass S, Delmas PD, Pearce G, Hendrich E, Tabensky A, Seeman E. The differing tempo of growth in bone size, mass, and density in girls is region-specific. *J Clin Invest.* 15 de septiembre de 1999;104(6):795-804.
212. Ellis KJ, Shypailo RJ, Pratt JA, Pond WG. Accuracy of dual-energy x-ray absorptiometry for body-composition measurements in children. *Am J Clin Nutr.* noviembre de 1994;60(5):660-5.
213. Figueroa-Colon R, Mayo MS, Treuth MS, Aldridge RA, Weinsier RL. Reproducibility of dual-energy X-ray absorptiometry measurements in prepubertal girls. *Obes Res.* julio de 1998;6(4):262-7.
214. Erlichman M, Holohan TV. Bone densitometry: patients with end-stage renal disease. *Health Technol Assess.* marzo de 1996;(8):1-27.
215. Ma J, Siminoski K, Alos N, Halton J, Ho J, Lentle B, et al. The choice of normative pediatric reference database changes spine bone mineral density Z-scores but not the relationship between bone mineral density and prevalent vertebral fractures. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo de 2015;100(3):1018-27.
216. Sbrocchi AM, Rauch F, Matzinger M, Feber J, Ward LM. Vertebral fractures despite normal spine bone mineral density in a boy with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* enero de 2011;26(1):139-42.
217. Gafni RI, Baron J. Overdiagnosis of osteoporosis in children due to misinterpretation of dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA). *J Pediatr.* febrero de 2004;144(2):253-7.
218. Bachrach LK. Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) measurements of bone density and body composition: promise and pitfalls. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM.* septiembre de 2000;13 Suppl 2:983-8.
219. Gilsanz V, Gibbens DT, Roe TF, Carlson M, Senac MO, Boechat MI, et al. Vertebral bone density in children: effect of puberty. *Radiology.* marzo de 1988;166(3):847-50.

## Bibliografía

220. Gilsanz V, Roe TF, Mora S, Costin G, Goodman WG. Changes in vertebral bone density in black girls and white girls during childhood and puberty. *N Engl J Med.* 5 de diciembre de 1991;325(23):1597-600.
221. Bertelloni S, Baroncelli GI, Ferdeghini M, Perri G, Saggese G. Normal volumetric bone mineral density and bone turnover in young men with histories of constitutional delay of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* diciembre de 1998;83(12):4280-3.
222. Herzog D, Bishop N, Glorieux F, Seidman EG. Interpretation of bone mineral density values in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* noviembre de 1998;4(4):261-7.
223. Comité de Expertos de la SEIOMM. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2009;1(1).
224. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* agosto de 2007;18(8):1033-46.
225. Black DM, Steinbuch M, Palermo L, Dargent-Molina P, Lindsay R, Hoseyni MS, et al. An assessment tool for predicting fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2001;12(7):519-28.
226. Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study. *Bone.* enero de 2003;32(1):78-85.
227. Osteoporosis: review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis. Executive summary. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 1998;8 Suppl 4:S3-6.
228. Nelson HD, Helfand M, Woolf SH, Allan JD. Screening for postmenopausal osteoporosis: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 17 de septiembre de 2002;137(6):529-41.
229. Hippisley-Cox J, Coupland C. Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores. *BMJ.* 20 de noviembre de 2009;339:b4229.
230. Golden NH, Abrams SA, Nutrition CO. Optimizing Bone Health in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 1 de octubre de 2014;134(4):e1229-43.
231. Soliman A, Sanctis VD, Elalaily R. Nutrition and pubertal development. *Indian J Endocrinol Metab.* 11 de enero de 2014;18(7):39.
232. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 de abril de 2018;
233. Bonjour J, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. Le pic de masse osseuse: réalités et incertitudes. *Arch Pédiatrie.* 1 de mayo de 1995;2(5):460-8.

234. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC, et al. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 de octubre de 1992;75(4):1060-5.
235. Moreno Perea M. González-Hachero J. Morón Romero MC. Vázquez Gámez MA. Pérez Cano R. Contenido mineral óseo en niños normales. *An Esp Pediatr.* 1994;41:31-5.
236. del Rio L, Carrascosa A, Pons F, Gusinyé M, Yeste D, Domenech FM. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res.* marzo de 1994;35(3):362-6.
237. Marco Hernández M, Méndez Fernández MJ, Ruiz Ramírez JC. Variaciones de la densidad y de la concentración mineral ósea entre distintas comunidades. *An Pediatría.* 1 de enero de 2000;52(4):319-26.
238. 180. Armada MI, Alonso t, Viña E, Bueno G, Ruibal JL, Zuluaga P. Mineralización ósea: densidad mineral ósea en columna lumbar de una muestra de población menor de 21 años (II). *Acta Pediatr Esp.* 1998;56.
239. Paccou J, Fardellone P, Cortet B. Cystic fibrosis-related bone disease. *Curr Opin Pulm Med.* noviembre de 2013;19(6):681-6.
240. Buntain HM, Schluter PJ, Bell SC, Greer RM, Wong JCH, Batch J, et al. Controlled longitudinal study of bone mass accrual in children and adolescents with cystic fibrosis. *Thorax.* febrero de 2006;61(2):146-54.
241. Haworth CS. A prospective study of change in bone mineral density over one year in adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1 de agosto de 2002;57(8):719-23.
242. Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int.* enero de 2010;86(1):1-7.
243. Cooper C, Dennison EM, Leufkens HGM, Bishop N, van Staa TP. Epidemiology of childhood fractures in Britain: a study using the general practice research database. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* diciembre de 2004;19(12):1976-81.
244. Khosla S, Melton LJ, Dekutoski MB, Achenbach SJ, Oberg AL, Riggs BL. Incidence of childhood distal forearm fractures over 30 years: a population-based study. *JAMA.* 17 de septiembre de 2003;290(11):1479-85.
245. Bonnick SL, Lewis LA. An Introduction to conventions in Densitometry. En: *Bone Densitometry for Technologists.* 3.ª ed. Denton, TX, USA: Springer New York; 2013. p. 1-26.
246. Catherine M. Gordon. Evaluation of bone density in children. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 2005;12:444-51.

## Bibliografía

247. Watts NB. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. noviembre de 2004;15(11):847-54.
248. Walker-Bone K, Reid DM, Cooper C. Is screening for osteoporosis worthwhile? *Br Med Bull*. 1 de enero de 1998;54(4):915-27.
249. Writing Group for the ISCD Position Development Conference. Diagnosis of osteoporosis in men, premenopausal women, and children. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom*. 2004;7(1):17-26.
250. Bianchi ML. Osteoporosis in children and adolescents. *Bone*. octubre de 2007;41(4):486-95.
251. Wren TAL, Kalkwarf HJ, Zemel BS, Lappe JM, Oberfield S, Shepherd JA, et al. Longitudinal Tracking of Dual-Energy X-ray Absorptiometry Bone Measures Over 6 Years in Children and Adolescents: Persistence of Low Bone Mass to Maturity. *J Pediatr*. junio de 2014;164(6):1280-1285.e2.
252. Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Ruiz JC, Vrielynck S, Heuillon B, Azhar I, et al. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de mayo de 2007;175(9):951-7.
253. Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ, Delmas PD. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab*. mayo de 1990;70(5):1330-3.
254. Ruiz JC, Mandel C, Garabedian M. Influence of spontaneous calcium intake and physical exercise on the vertebral and femoral bone mineral density of children and adolescents. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mayo de 1995;10(5):675-82.
255. Ruiz JC, Mandel C. Relation between calcium intake and bone mass in children and adolescents. *Presse Med*. 1991;20:2220.
256. Gronowitz E, Garemo M, Lindblad A, Mellström D, Strandvik B. Decreased bone mineral density in normal-growing patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. junio de 2003;92(6):688-93.
257. Douros K, Loukou I, Nicolaidou P, Tzonou A, Doudounakis S. Bone mass density and associated factors in cystic fibrosis patients of young age. *J Paediatr Child Health*. diciembre de 2008;44(12):681-5.
258. Chirita-Emandi A, Shepherd S, Kyriakou A, McNeilly JD, Dryden C, Corrigan D, et al. A retrospective analysis of longitudinal changes in bone mineral content in cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 28 de agosto de 2017;30(8):807-14.
259. Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, Chelchowska M, Laskowska-Klita T. Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci*. 2013;58(2):338-43.
260. Jakovska T. Analysis of Bone Metabolism in Children with Cystic Fibrosis. *Pril Makedon Akad Na Nauk Umet Oddelenie Za Med Nauki*. 1 de julio de 2018;39(1):151-5.

261. Greer RM, Buntain HM, Potter JM, Wainwright CE, Wong JC, O'Rourke PK, et al. Abnormalities of the PTH-vitamin D axis and bone turnover markers in children, adolescents and adults with cystic fibrosis: comparison with healthy controls. *Osteoporos Int.* 1 de junio de 2003;14(5):404-11.
262. Baroncelli GI, De Luca F, Magazzú G, Arrigo T, Sferlazzas C, Catena C, et al. Bone demineralization in cystic fibrosis: evidence of imbalance between bone formation and degradation. *Pediatr Res.* marzo de 1997;41(3):397-403.
263. Schulze KJ, O'Brien KO, Germain-Lee EL, Booth SL, Leonard A, Rosenstein BJ. Calcium kinetics are altered in clinically stable girls with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* julio de 2004;89(7):3385-91.
264. Le Heron L, Guillaume C, Velard F, Braux J, Touqui L, Moriceau S, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* enero de 2010;9(1):69-72.
265. Bianchi ML, Romano G, Saraifoger S, Costantini D, Limonta C, Colombo C. BMD and Body Composition in Children and Young Patients Affected by Cystic Fibrosis. *J Bone Miner Res.* 1 de marzo de 2006;21(3):388-96.
266. Stalvey MS, Clines KL, Havasi V, McKibbin CR, Dunn LK, Chung WJ, et al. Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease. *PLoS One.* 2013;8(11):e80098.
267. Pashuck TD, Franz SE, Altman MK, Wasserfall CH, Atkinson MA, Wronski TJ, et al. Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation. *Pediatr Res.* marzo de 2009;65(3):311-6.
268. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, et al. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science.* 21 de agosto de 1992;257(5073):1083-8.
269. Dif F, Marty C, Baudoin C, de Vernejoul M-C, Levi G. Severe osteopenia in CFTR-null mice. *Bone.* septiembre de 2004;35(3):595-603.
270. Shead EF, Haworth CS, Barker H, Bilton D, Compston JE. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* marzo de 2010;9(2):93-8.
271. M. Pombo, L. Audí, M. Bueno, R. Calzada, F. Cassorla, C. Diéguez, A. Ferrández, J. J. Heinrich, R. Lanes, M. Moya, R. Sandrini, R. Tojo. *Tratado de Endocrinología Pediátrica.* 4.<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2009.
272. Lambert JP. Osteoporosis: A New Challenge in Cystic Fibrosis. *Pharmacotherapy.* 2000;20:34-51.
273. Ionescu AA, Nixon LS, Evans WD, Stone MD, Lewis-Jenkins V, Chatham K, et al. Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* septiembre de 2000;162(3 Pt 1):789-94.

## Bibliografía

274. MacRae VE, Farquharson C, Ahmed SF. The pathophysiology of the growth plate in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. enero de 2006;45(1):11-9.
275. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, Zakharova E, Avakian L, Kapranov N, et al. TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J Transl Med*. 23 de enero de 2013;11:19.
276. Li Y, Li A, Strait K, Zhang H, Nanes MS, Weitzmann MN. Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mayo de 2007;22(5):646-55.
277. Street ME, Spaggiari C, Ziveri MA, Volta C, Federico G, Baroncelli GI, et al. Analysis of bone mineral density and turnover in patients with cystic fibrosis: associations between the IGF system and inflammatory cytokines. *Horm Res*. 2006;66(4):162-8.
278. Street ME, Ziveri MA, Spaggiari C, Viani I, Volta C, Grzincich GL, et al. Inflammation is a modulator of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein system inducing reduced bioactivity of IGFs in cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol*. enero de 2006;154(1):47-52.
279. Conway SP. Osteoporosis and osteopenia in adults and adolescents with cystic fibrosis: prevalence and associated factors. *Thorax*. 1 de septiembre de 2000;55(9):798-804.
280. Conway SP, Wolfe SP, Brownlee KG, White H, Oldroyd B, Truscott JG, et al. Vitamin K status among children with cystic fibrosis and its relationship to bone mineral density and bone turnover. *Pediatrics*. mayo de 2005;115(5):1325-31.
281. Suttie JW. The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:399-417.
282. Durie PR. Vitamin K and the management of patients with cystic fibrosis. *CMAJ Can Med Assoc J*. 1 de octubre de 1994;151(7):933-6.
283. Nicolaidou P, Stavrinadis I, Loukou I, Papadopoulou A, Georgouli H, Douros K, et al. The effect of vitamin K supplementation on biochemical markers of bone formation in children and adolescents with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr*. agosto de 2006;165(8):540-5.
284. Rashid M, Durie P, Andrew M, Kalnins D, Shin J, Corey M, et al. Prevalence of vitamin K deficiency in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr*. septiembre de 1999;70(3):378-82.
285. During A, Penel G, Hardouin P. Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res*. julio de 2015;59:126-46.
286. Teichgräber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmüller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med*. abril de 2008;14(4):382-91.

287. Strandvik B. Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. septiembre de 2010;83(3):121-9.
288. Worgall TS, Veerappan A, Sung B, Kim BI, Weiner E, Bholah R, et al. Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory tract induces airway hyperreactivity. Sci Transl Med. 22 de mayo de 2013;5(186):186ra67.
289. Xu Y, Krause A, Limberis M, Worgall TS, Worgall S. Low sphingosine-1-phosphate impairs lung dendritic cells in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. febrero de 2013;48(2):250-7.
290. Petrie Aronin CE, Shin SJ, Naden KB, Rios PD, Sefcik LS, Zawodny SR, et al. The enhancement of bone allograft incorporation by the local delivery of the sphingosine 1-phosphate receptor targeted drug FTY720. Biomaterials. septiembre de 2010;31(25):6417-24.
291. Matsuzaki E, Hiratsuka S, Hamachi T, Takahashi-Yanaga F, Hashimoto Y, Higashi K, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of  $\beta$ -catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines. Bone. agosto de 2013;55(2):315-24.
292. Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. Trends Endocrinol Metab TEM. octubre de 2007;18(8):300-7.
293. Kleuser B, Cuvillier O, Spiegel S. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. Cancer Res. 1 de mayo de 1998;58(9):1817-24.
294. Manggau M, Kim DS, Ruwisch L, Vogler R, Korting HC, Schäfer-Korting M, et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. J Invest Dermatol. noviembre de 2001;117(5):1241-9.





**ANEXOS**



## ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE Y FAMILIA

Estimado paciente y/o padres:

Como ya sabe, usted o su hijo ha sido diagnosticado con una enfermedad llamada Fibrosis Quística. Hoy en día existen numerosas cuestiones en dicha enfermedad que desconocemos cuya respuesta podrían ayudarnos a conocer mejor la enfermedad y mejorar por tanto la atención a los pacientes. Actualmente, estamos llevando a cabo un proyecto de investigación con objeto de conocer algunas de estas cuestiones no resueltas, por lo que le pedimos su colaboración en este proyecto.

Este estudio ha obtenido la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío y en él se respetarán las recomendaciones éticas internacionales para estudio con seres humanos (Declaración de Helsinki). El objetivo de este proyecto es estudiar si la densidad mineral ósea (DMO), o sea, la cantidad de minerales que hay en los huesos y el estudio de los marcadores de remodelado óseo se encuentran alterados en estos pacientes y si está relacionada con la presencia de alteraciones en la columna vertebral como cifosis y fracturas o algunas moléculas en sangre.

Durante su participación en el estudio será necesario cuantificar los marcadores de remodelado óseo coincidiendo con la extracción sanguínea que todos los años se realiza por su enfermedad y un análisis de composición de los huesos mediante densitometría. Todas estas pruebas son habituales en el ejercicio de la medicina de nuestro centro y en ella se tienen en cuenta los efectos adversos que puedan ocasionar que, en estos casos, son poco frecuentes y por lo general menores.

Los beneficios que se derivarán de este tipo de estudio serán un mayor conocimiento de las alteraciones óseas de los pacientes pediátricos con FQ, sus repercusiones en el resto del organismo y en la calidad de vida de los pacientes.

Debe saber que Ud. no obtendrá beneficio alguno por su participación en este estudio y que su participación en el proyecto es altruista, por lo que no recibirá ninguna compensación económica ni de ningún otro tipo por su colaboración. Además, su colaboración es completamente voluntaria, lo que significa que podrá retirar su consentimiento y dejar de participar en el estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con el equipo médico que le atiende ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Sus datos personales como participante del estudio se mantendrán bajo estricta confidencialidad (Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal). Las muestras biológicas relacionadas con su caso estarán numeradas con un código para garantizar la confidencialidad de la muestra. La investigadora principal sólo utilizará los datos personales únicamente para localizarle en caso de que surja alguna eventualidad relacionada con el proyecto.

Si tiene dudas sobre esta investigación puede contactar con los investigadores vía email

(josefa.mora.sspa@juntadeandalucia.es ó

isabel.delgado.sspa@juntadeandalucia.es) o

en el teléfono de la Unidad de Fibrosis Quística, 955012857.

Consentimiento informado:

Yo, \_\_\_\_\_

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra. Isabel Delgado Pecellín con N°. colegiado 41/15538

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Sevilla, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del participante o su representante legal.

## ANEXO II. INFORMACIÓN AL PACIENTE SOBRE EL ESTUDIO “DENSITOMETRÍA ÓSEAS Y MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN PACIENTES FQ”

El trabajo de investigación “Densitometría óseas y marcadores de remodelado óseo en pacientes con fibrosis quística (FQ)” está siendo realizado por la investigadora principal Josefa Mora Vallellano y dirigido por los doctores José Luis López-Campos Bodineau, Carmen Delgado Pecellín e Isabel Delgado Pecellín. Tiene como objeto estudiar la densidad y la fortaleza de los huesos en los pacientes que padecen fibrosis quística. Nuestros pacientes, debido a su enfermedad, se ven sometidos a diversas situaciones clínicas (ej. mal estado nutricional, inflamación crónica, inactividad física, insuficiencia pancreática, etc) inherentes a la misma, que puede producir un deterioro en la calidad de los huesos y en algunos casos desencadenar fracturas con mayor facilidad que la población general y de peor resolución. Estas fracturas por debilidad del hueso, pueden contribuir al deterioro de la función pulmonar así como a una disminución de la talla. Se estima importante conocer la existencia de una densidad mineral ósea disminuida ya desde la infancia en los pacientes con FQ y el posterior riesgo de fractura mediante los test validados en la población pediátrica de FQ.

En el estudio se realizan:

Densitometría ósea de columna lumbar y cuello fémur. Dicha prueba consiste en un estudio radiográfico que determina la densidad de los huesos y cuya radiación es equivalente a una radiografía simple.

Analíticas de sangre para ver los niveles en sangre de los marcadores de remodelado óseo.

Con ello se intenta testar a los pacientes que requieren un tratamiento farmacológico para preservar la densidad del hueso y también se propone crear las bases de futuros estudios para ayudar a mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes sin perder la esperanza en un futuro tratamiento curativo definitivo.

Les saluda Atentamente: Los Doctores López-Campos Bodineau, Delgado Pecellín, Mora Vallellano.

## ANEXO III. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE Y FAMILIA

Estimado paciente y/o padres:

En el estudio de investigación: “Densidad mineral ósea y marcadores de remodelado óseo en pacientes Fibrótico quísticos (FQ)” que estamos llevando a cabo y que ha obtenido la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío y en el se respetarán las recomendaciones éticas internacionales para estudio con seres humanos (Declaración de Helsinki), el objetivo es estudiar si la densidad mineral ósea (DMO), o sea, la cantidad de minerales que hay en los huesos y el estudio de los marcadores de remodelado óseo se encuentran alterados en pacientes FQ y si está relacionada con la presencia de alteraciones en la columna vertebral como cifosis y fracturas o algunas moléculas en sangre.

Le pedimos su colaboración en este proyecto, como paciente no afecto de FQ y sin enfermedades que puedan interferir el metabolismo óseo, para que nos ayude a profundizar en el conocimiento de estas alteraciones. y poder mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide participar, se le realizará una historia clínica, una exploración física, y se le extraerán dos tubos adicionales para obtener dos muestras de suero. Todo ello coincidiendo con su visita a las consultas externas del Hospital Virgen del Rocío.

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, podría beneficiar en un futuro a estos pacientes que la padecen y

contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

Se le pedirá su consentimiento para que con su sangre se puedan determinar diferentes parámetros analíticos dirigidos al estudio del metabolismo óseo.

Sus datos personales como participante del estudio se mantendrán bajo estricta confidencialidad (Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal).

Las muestras biológicas relacionadas con su caso estarán numeradas con un código para

garantizar la confidencialidad de la muestra.

Si tiene dudas sobre esta investigación puede contactar con los investigadores vía email

(josefa.mora.sspa@juntadeandalucia.es

ó

isabel.delgado.sspa@juntadeandalucia.es) o

en el teléfono de la Unidad de Fibrosis Quística, 955012857.

Consentimiento informado:

Yo, \_\_\_\_\_

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra. Isabel Delgado Pecellín con N<sup>o</sup>. colegiado 41/15538

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Sevilla, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del participante o su representante legal.

## ANEXO IV. INFORMACIÓN AL PACIENTE SOBRE EL ESTUDIO “DENSITOMETRÍA ÓSEAS Y MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN PACIENTES FQ”

El trabajo de investigación “Densitometría óseas y marcadores de remodelado óseo en pacientes con fibrosis quística (FQ)” está siendo realizado por la investigadora principal Josefa Mora Vallellano y dirigido por los doctores José Luis López-Campos Bodineau, Carmen Delgado Pecellín e Isabel Delgado Pecellín.

Se solicita la participación en este proyecto de investigación, cuyo objetivo principal es profundizar en el conocimiento de la densidad mineral ósea y remodelado óseo de los pacientes Fibrótico quísticos. Los estudios que implican a niños en edad temprana podrían revelar los orígenes de CFBD (enfermedad ósea relacionada con la fibrosis quística) que repercute en la calidad de vida de estos pacientes, y con ello poder cambiar la práctica clínica.

Para el estudio se requieren pacientes sanos, no afectados de FQ, ni de cualquier otra enfermedad que pueda causar alteración del metabolismo óseo, para ser tratados como grupo control, tomándolos como referencia.

En el estudio se realizan:

Analíticas de sangre para ver los niveles de los marcadores de remodelado óseo, coincidiendo con una extracción de sangre solicitada por el motivo que acude el paciente a consulta, no siendo este interferente en nuestro estudio.

Les saluda Atentamente: Los Doctores López Campos Bodineau, Delgado Pecellín, Mora Vallellano.

