



TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU CONTROL METABÓLICO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE EXTIRPE OSTEOBLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA, EN NIÑOS Y ADULTOS JÓVENES

Ramón Pérez Temprano

2015

Directores de la Tesis

Dr. Ramón Pérez Cano

Dra. Mercedes Giner García

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Diabetes Mellitus

1.1 Concepto y clasificación

1.2 Datos epidemiológicos

1.3 Criterios diagnósticos

1.4 Principales alteraciones metabólicas

1.5 Factores etiológicos

1.6 Complicaciones clínicas

1.7 Microangiopatía diabética

1.7.1 Retinopatía diabética

1.7.2 Nefropatía diabética

1.7.3 Neuropatía diabética

1.8 Macroangiopatía diabética

1.8.1 Corazón y diabetes mellitus

1.8.2 Enfermedad cerebrovascular y diabetes mellitus

1.8.3 Enfermedad vascular periférica y diabetes mellitus

2. Tejido óseo

2.1 Generalidades

2.2 Matriz ósea

2.3 Células óseas

2.4 Células de linaje osteoblástico: osteoblasto, células de revestimiento (lining cells) y osteocitos

2.4.1 Osteoblasto

2.4.2 Células de revestimiento

2.4.3 Osteocitos

2.4.4 Osteoclastos

3. Remodelado óseo

3.1 Concepto

3.2 Regulación

3.3 Sistémica

3.4 Locales

3.5 Sistema RANK/RANKL/OPG

3.6 Receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK)

3.7 Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK)

3.8 Osteoprotegerina

4. Diabetes y masa ósea

4.1 Diabetes Mellitus tipo 1 y masa ósea

4.2 Diabetes Mellitus tipo 2 y masa ósea

5. Diabetes y fractura

5.1 Diabetes Mellitus tipo 1 y fractura

5.2 Diabetes Mellitus tipo 2 y fractura

6. Mecanismos fisiopatológicos que pueden estar implicados en las alteraciones del metabolismo óseo de la diabetes mellitus

6.1 Alteraciones en la biología celular ósea

6.2 Papel de la insulina, otras hormonas osteotrópicas derivadas del páncreas y hormonas derivadas del tejido graso sobre el metabolismo óseo

6.3 Acción pleiotrópica de la osteocalcina

6.4 Influencia de la hiperglucemia y AGEs sobre el metabolismo óseo

6.4.1 Hiperglucemia

6.4.2 AGEs

6.4.3 Recetor de AGEs (AGER)

6.4.4 Efectos de la unión AGEs-AGER sobre el tejido óseo

6.4.5 Efecto de las terapias antidiabéticas sobre el hueso

7. Células precursoras de estirpe osteoblástica en sangre periférica

7.1 Introducción

7.2 Origen celular y tisular de las células circulantes osteogénicas

7.3 Papel fisiológico y fisiopatológico

7.4 CPOs en las DM tipo 2

7.5 Contribución de las células progenitoras circulantes a las complicaciones de la Diabetes Mellitus

7.5.1 La plasticidad de las células progenitoras circulantes

7.5.2 Células osteoprogenitoras y complicaciones cardiovasculares de la Diabetes Mellitus

8. Justificación del tema

II. HIPÓTESIS

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Características del estudio

2. Población estudiada

2.1 Criterios de inclusión

2.2 Criterios de exclusión

3. Obtención de muestras

3.1 Suero sanguíneo

3.2 Determinación de densidad mineral ósea

4. Datos clínicos

4.1 Datos de filiación y generales

4.2 Medidas antropométricas

5. Determinaciones bioquímicas

6. Determinaciones densitométricas

7. Cuantificación de células de estirpe osteoblástica en sangre periférica

7.1 Extracción de células mononucleares

7.2 Conteo celular

7.3 Estudio de viabilidad celular

8. Citometría de flujo

8.1 Inmunotinción

8.2 Análisis citómetro de flujo

9. Análisis estadístico

V. RESULTADOS

VI. DISCUSIÓN

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

IX. ANEXO

X. ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

1.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, participando en su desarrollo diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales.

Se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción ó en la acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Los principales síntomas de la hiperglucemia son la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa.

La afección tiene gran repercusión social y económica en nuestro país, ya que se encuentra entre las cinco enfermedades más frecuentes y puede producir numerosas complicaciones clínicas.

La clasificación etiológica se expone en la tabla 1 (1).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes

I. Diabetes Tipo 1

- A. Inmunomediada
- B. Idiopática

II. Diabetes Tipo 2

III. Otros tipos específicos:

- A. Defectos genéticos en la función de la célula B.
- B. Defectos genéticos de la acción de la insulina
- C. enfermedades del páncreas exócrino
- D. endocrinopatías
- E. Inducida por tóxicos ó agentes químicos
- F. Infecciones
- G. formas no comunes de diabetes inmunomediata
- H. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes

IV. Diabetes Mellitus Gestacional

Tabla 1. Standards of Medical Care in Diabetes 2014. Diabetes Care 2014; 37:S14-S80 (1)

1.2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

La prevalencia de la diabetes mellitus está creciendo rápidamente en el mundo como consecuencia del envejecimiento y los cambios en el estilo de vida (2).

El número de personas en el mundo con diabetes se ha más que duplicado en las últimas tres décadas (3).

En el 2010, se estimaba que 285 millones de personas en el mundo tenían diabetes, de los cuales el 90% eran de tipo 2. Las estimaciones para el 2030 serán que 439 millones de personas padecerán DM, representando aproximadamente el 7.7% de los adultos entre los 20 y 79 años (4,5)(Figura 1).

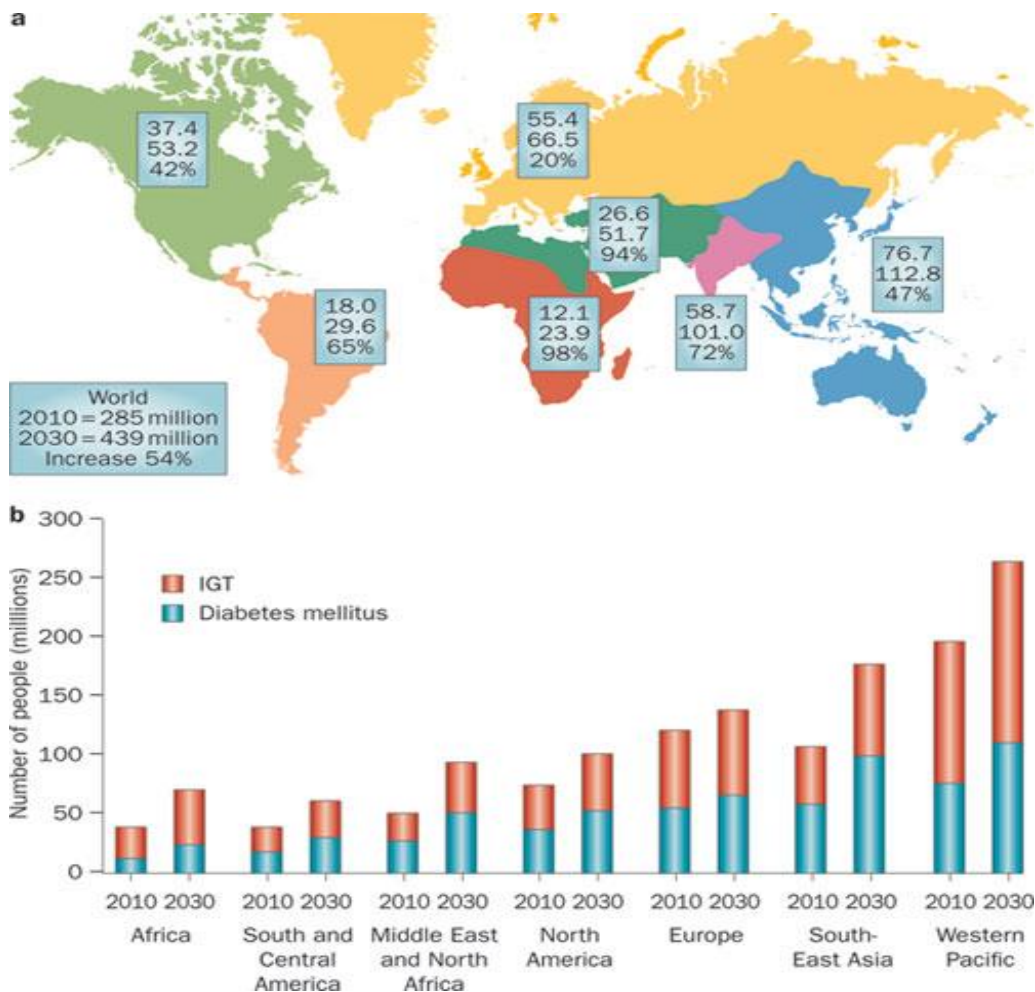


Figura 1. Epidemiología de la DM2. (a) Proyección mundial (5). (b) Estimaciones de padecer Diabetes o Intolerancia glucídica en el 2030.

La diabetes mellitus tipo 2 se ha considerado tradicionalmente un trastorno metabólico que padecían sólo de adultos, pero actualmente se ha observado que es bastante común en adultos jóvenes e incluso en adolescentes y niños (6).

Además, esta prevalencia en jóvenes no sólo está aumentando, sino que la situación metabólica de prediabetes también lo está haciendo. Los últimos datos publicados en el estudio NHANES revelan un incremento del 87.1% en la prevalencia de la glucemia basal alterada en adolescentes, variando del 7% en el años 2000 al 13.1% en 2006, entre jóvenes americanos de 12 a 19 años. (7,8)

La prevalencia de prediabetes es incluso más elevada en poblaciones pediátricas que tienen otros factores de riesgo, tales como obesidad, hiperinsulinemia o antecedentes familiares de DM. (9,10).

En España, diferentes estudios han establecido distintos niveles de prevalencia de DM, mostrando la mayoría de ellos un nivel de prevalencia que varía entre el 10 y el 15%, más elevado, por tanto, de lo previamente considerado (11). En el año 2012 se publica un estudio (12) representativo de prevalencia de DM en España con muestra representativa del conjunto del país y se evalúa su asociación con los distintos factores de riesgo. La muestra se recogió durante 2009-2010, estudiándose a 5072 personas mayores de 18 años (41.6% varones y 58.4% mujeres). A toda la muestra se le realizó determinación de glucemia basal en ayunas y test de sobrecarga oral de glucosa, recogiendo además distintos parámetros antropométricos, estilo de vida e historia familiar de DM. La DM se diagnosticó y se clasificó con los criterios de WHO de 1999 (13).

La prevalencia total de DM ajustada por edad y sexo fue de 13.8% (95%IC 12.8%-14.7%), de los que aproximadamente la mitad desconocían la existencia de la enfermedad. Los niveles de prevalencia de glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa o ambas alteraciones combinadas fue de 3.4%, 9.2% y 2.2% respectivamente. La prevalencia de DM aumentaba progresivamente con la edad, llegando a ser del 34.7% en varones mayores de 76 años y del 41,3 % en las mujeres de la misma edad.

En el mismo estudio se realiza un análisis multivariable de regresión logística, encontrando que la presencia de diabetes estaba significativamente asociada con la edad (OR: 1.05; 95% IC: 1.04-1.06), el

sexo (menos frecuente en mujeres, OR: 0.34; 95% IC: 0.28-0.45), el nivel de educación (más riesgo en personas de menor nivel educativo, OR:1.28; 95% IC: 1.02-1.62), la obesidad (OR:1.70; 95% IC: 1.37-2.05), la obesidad abdominal (OR: 2.2; 95% IC: 1.75-2.76), la presión arterial elevada (OR: 2.26; 95% IC: 1.77-2.87), cHDL bajo (OR: 1.54; 95% IC: 1.25-1.91), niveles elevados de triglicéridos (OR: 1.99; 95% IC: 1.60-2.48) e historia familiar de DM (OR: 2.70; 95% IC: 2.21-3.31).

1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Para el diagnóstico preciso, además de evaluar los síntomas clínicos característicos, es necesario apoyarse en el análisis químico de los niveles de glucosa en sangre. Como los síntomas de la diabetes no son obvios inmediatamente, el diagnóstico puede estar precedido por un extenso período de deterioro en la tolerancia a la glucosa, lo que resulta en disfunciones de las células pancreáticas y complicaciones micro y macrovasculares. El diagnóstico se establece al cumplirse cualquiera de los siguientes criterios:

- 1) Presencia de los síntomas clásicos y una glucemia plasmática casual mayor o igual a 200 mg/dL,
- 2) Una glucemia plasmática en ayuno, mayor o igual a 126 mg/dL,
- 3) Una glucemia mayor o igual a 200 mg/dL, 2 horas después de una carga oral de 75 g de glucosa disuelta en agua.

Es conveniente repetir la prueba para confirmar el diagnóstico.

La interpretación de los resultados del nivel de glucosa plasmática en ayunas es la siguiente:

- 1) Menor o igual a 110 mg/dL = glucosa normal
- 2) Mayor o igual a 110 mg/dL y menor o igual a 126 mg/dL = Glucemia basal alterada
- 3) Mayor o igual a 126 mg/dL = diagnóstico provisional de diabetes.

La interpretación de una curva de tolerancia a la glucosa (CGT) es la siguiente:

- 1) Cifra menor o igual a 140 mg/dL a las 2 h poscarga (2HPG) = tolerancia normal a la glucosa.
- 2) Cifra mayor o igual a 140 mg/dL y menor o igual a 200mg/dL (2HPG) = tolerancia anormal a la glucosa.
- 3) Cifra mayor o igual a 200 mg/dL (2HPG) = diagnóstico provisional de diabetes.

El diagnóstico de diabetes gestacional se establece si durante las semanas 24 a 28 del embarazo se presentan dos o más de los siguientes valores:

- 1) 105 mg/dL o más en ayuno
 - 2) valores superiores a 190 mg/dL, 165 mg/dL y 145 mg/dL a la hora, dos horas y tres horas después de una postcarga. El análisis se efectúa después de una carga de 100 g de glucosa en ayuno.
- (14)

1.4. PRINCIPALES ALTERACIONES METABÓLICAS

En la diabetes mellitus tipo 1 las alteraciones del metabolismo se deben a la destrucción de las células β del páncreas. A medida que ésta progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento en la concentración de glucosa en sangre y una disminución en la entrada de ésta en el músculo y el tejido adiposo.

Por otro lado, la disminución de la insulina en el hígado, así como el relativo exceso de glucagón, producen un aumento en la degradación del glucógeno y de la glucogénesis, lo que contribuye a un incremento adicional de la glucosa sanguínea. Este exceso sobrepasa la capacidad de reabsorción en el riñón de la glucosa, eliminándose por la orina y arrastrándose con ella agua y sales.

La escasez de glucosa como fuente de energía da como consecuencia la necesidad de utilizar las grasas y degradar las proteínas, principalmente musculares, para la obtención de aminoácidos. La degradación proteica produce un aumento de la urea y un balance negativo de nitrógeno, y la

lipólisis, favorecida por la falta de glucosa en el adipocito, aumenta la concentración de ácidos grasos y cuerpos cetónicos.

En la descompensación de la diabetes tipo 1, se produce un catabolismo excesivo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, ocasionando un exceso de cuerpos cetónicos, provocando cetoacidosis y coma diabético.

La cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la diabetes tipo 1 y la tipo 2. La diferencia radica en la cantidad de insulina que existe entre las dos situaciones clínicas. Aparentemente, la cantidad de insulina producida en la diabetes de tipo 2 es capaz de bloquear la producción de ácidos grasos a partir de la lipólisis, lo que evita la sobreproducción de cuerpos cetónicos. En general, los desarreglos metabólicos en la diabetes tipo 1 se explican por la falta de insulina; sin embargo, las bases metabólicas de la diabetes tipo 2 no son tan evidentes

Un rasgo patológico habitual en la diabetes mellitus tipo 2 es la hiperinsulinemia asociada a un estado de resistencia insulínica. Componentes del síndrome metabólico como un aumento de los triglicéridos plasmáticos, disminución en las concentraciones de HDL colesterol, presión arterial elevada y aumento del perímetro abdominal son hallazgos frecuentemente encontrados. La diabetes sobreviene cuando las células β pancreáticas no producen la cantidad extra de insulina necesaria para contrarrestar los efectos de la resistencia (15).

1.5. FACTORES ETIOLÓGICOS

La diabetes tipo 1 aparece en los primeros años de vida, y se origina por una destrucción autoinmune selectiva de las células β -pancreáticas productoras de insulina, participando en el proceso tanto la respuesta humoral como la celular. El proceso autoinmune es progresivo y comienza años antes de que la destrucción sea total. En este tipo de diabetes la expresión clínica es muy heterogénea y puede confundirse con la diabetes tipo 2 en pacientes que desarrollan la enfermedad a mayor edad (16). La incidencia geográfica de la enfermedad es variable, lo que parcialmente puede explicarse por la variedad de factores ambientales involucrados, que constituyen una parte de su origen, ya que la otra está modulada por factores genéticos. Considerando este último aspecto, se ha sugerido que la variación geográfica se relaciona con una diferente distribución de genes de susceptibilidad (17).

La participación genética en la diabetes se ha establecido al estudiar la concordancia de aparición entre gemelos, sin embargo, el decremento en dicha concordancia implica la presencia de diversos factores ambientales (como virus y otros patógenos) en el desarrollo de la enfermedad. En general se acepta que la influencia genética varía entre 25 y 50% (18).

Las causas que desencadenan la diabetes tipo 2 se desconocen en el 70-85% de los pacientes, influyendo una herencia poligénica, junto con factores nutricionales y ambientales (19).

La influencia de estos factores se ha estudiado en los indios Pima. Existe una población que viven en Arizona, consumen dietas con alto contenido calórico, tienen poca actividad física y mucha obesidad. En ellos se presenta un 37% de diabetes en las mujeres y un 54% en hombres. Sin embargo, los indios Pima que habitan las montañas del norte de México, con actividad física intensa, dieta baja en calorías y peso corporal normal, padecen DM un 10.5% de las mujeres y 6.3% de los hombres (20).

La susceptibilidad familiar a la DM tipo 2 es muy elevada, como lo sugiere que la concordancia promedio en gemelos monocigóticos es del 50-75% (21). En este tipo, la influencia genética es del 12.5 % para la tercera generación, un 25% para el segundo grado y puede llegar hasta 100 % en gemelos monocigóticos. Los factores de riesgo incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y vida sedentaria. Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (22).

La diabetes llamada MODY, es una afección determinada por herencia monogénica, es decir, con la participación de un par de alelos, y clínicamente constituye un síndrome heterogéneo (23). Los estudios genéticos han identificado por lo menos 8 mutaciones asociados con las diferentes formas de la afección, algunas de las cuales afectan a factores de transcripción.

Por lo que respecta a la diabetes gestacional, ésta puede desarrollarse por una modificación en el sistema de regulación de la glucosa durante el embarazo y afectar al 2-7% de las mujeres. Después del parto, el metabolismo generalmente retorna a la normalidad, pero las pacientes con diabetes gestacional tienen un alto riesgo de desarrollar más tarde diabetes tipo 2 (24).

1.6. COMPLICACIONES CLÍNICAS

No todos los diabéticos responden con igual intensidad en la aparición de complicaciones; en algunos de ellos con deterioro crónico del control glucémico tardan en aparecer, mientras que en otros con leves desajustes metabólicos aparecen pronto signos de complicaciones, en especial, microangiopatía. Este hecho, que a veces se muestra con carácter familiar, pone de manifiesto que la aparición de complicaciones crónicas obedece a una causalidad múltiple en donde, incluso, habría que considerar aspectos genéticos.

También en las complicaciones agudas vemos que determinados sujetos diabéticos por su labilidad u otras causas tienen una mayor tendencia a la cetosis o a la hipoglucemia. En definitiva, no hay un patrón exacto en la aparición de complicaciones, sean crónicas o agudas, pero sí podemos decir que globalmente se corresponde a un patrón de mal control de la enfermedad.

Las dos complicaciones hiperglucémicas agudas más habituales en las personas diabéticas son la descompensación hiperglucémica cetoacidótica y la descompensación hiperglucémica hiperosmolar. Ambas situaciones, cada vez menos frecuentes en nuestro medio, constituyen, junto con las hipoglucemias graves, las principales causas de urgencias diabetológicas tributarias de ingreso hospitalario.

De las complicaciones crónicas derivadas de la diabetes, estas aparecen en los dos grandes tipos de diabetes mellitus y se pueden dividir en dos categorías: complicaciones microangiopáticas o manifestaciones específicas de la diabetes y complicaciones macroangiopáticas.

Las manifestaciones microangiopáticas o específicas se caracterizan por la afectación de los pequeños vasos de la microcirculación que afectan a la retina, el glomérulo y a los nervios periféricos y que se conocen como retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas. Debido a la enfermedad microvascular, la diabetes mellitus es hoy en día la primera causa de ceguera en el mundo occidental y de insuficiencia renal terminal.

La retinopatía diabética es poco frecuente en pacientes prepúberes con diabetes tipo 1, pero casi todos los pacientes con diabetes tipo 1 y más del 60% de los pacientes con diabetes tipo 2 desarrollan algún grado de retinopatía a los 20 años de evolución de la enfermedad. En pacientes con diabetes tipo 2, el 20% aproximadamente presentan retinopatía en el momento del diagnóstico de la diabetes. En pacientes menores de 18 años,

la retinopatía diabética es más frecuente en pacientes con diabetes tipo 1 que en pacientes con diabetes tipo 2 (20% vs 4%). Por el contrario, la microalbuminuria es más frecuente en pacientes con diabetes tipo 2 (25)

La diabetes aumenta 25 veces el riesgo de padecer insuficiencia renal y, en España, constituye la primera causa de inclusión en programas de hemodiálisis. La insuficiencia renal crónica se presenta en el 50% de los pacientes con diabetes tipo 1 con 10 años de evolución y en el 90% de los pacientes con una evolución de 20 o más años. También supone la primera causa de trasplante renal acompañado o no de trasplante pancreático.

Más del 60% de las personas con diabetes sufren alguna forma de neuropatía, con una prevalencia del 7.5% en el momento del diagnóstico y del 50% después de 25 años (26) . En España, la prevalencia de la neuropatía periférica es del 22% en los pacientes diabéticos y se incrementa con la edad y duración de la DM (27). El 90% de los pacientes con neuropatía son personas con diabetes tipo 2.

La publicación en 1993 del estudio americano “ Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT) demostró de forma clara cómo un tratamiento intensivo de la diabetes, al conseguir mejores controles glucémicos, evidenciados por un descenso de la HbA1c de un 2% respecto al grupo de pacientes con tratamiento convencional, contribuía a una disminución de la retinopatía del 76%, un 54% de la nefropatía y un 60% de la neuropatía. Ante estos resultados se preconizó la necesidad de mejorar al máximo el control glucémico, manteniendo la HbA1c por debajo de 7%, para garantizar la ausencia de complicaciones microangiopáticas. Similares conclusiones se obtuvieron del estudio UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) en 1998, realizado en pacientes con DM tipo 2; en él, por cada 1% de descenso de la HbA1c se obtuvo una mejoría del 21% en cada diana relacionada con la DM. Los pacientes asignados al grupo de tratamiento intensivo consiguieron disminuir un 25% el riesgo de microangiopatía en relación con el grupo de tratamiento convencional (28,29).

Es bien conocida la fuerte relación existente entre el grado y cronicidad de la hiperglucemia con la aparición de complicaciones microangiopáticas, si bien es cierto que aunque la hiperglucemia afecta a todas las células del organismo, no todas responden de igual manera, pudiendo resultar estas complicaciones más graves en algunos pacientes, aún manteniendo menos hiperglucemia que otros. La explicación de este hecho podemos deducirla

del conocimiento de determinadas mutaciones genéticas, cuya expresión puede afectar más a un órgano que a otro, o con mayor virulencia en unos pacientes que en otros. De igual forma, es un hecho a tener en cuenta y demostrado, la existencia de una “ memoria hiperglucémica”; es decir, pacientes con hiperglucemia crónica que tras normalizar su glucemia siguen manteniendo activos los mecanismos patogénicos que conducen a la complicación micro y macroangiopática.

Aunque todas las células del organismo están expuestas a la hiperglucemia cuando la DM está descompensada, sólo aquellas en las que se llega a producir aumento de la concentración intracelular de glucosa, como ocurre con el endotelio, van a sufrir la afectación microangiopática. Ésta afectación se inicia en estadios precoces de la diabetes, cuando la hiperglucemia es capaz de modificar el flujo vascular, la presión intracapilar y la permeabilidad capilar por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la disminución en la producción de óxido nítrico (NO) o la mayor sensibilidad para la angiotensina II, entre otros. En cualquier caso, la consecuencia de estas alteraciones es un progresivo estrechamiento de la luz vascular, motivado por la presencia en la pared vascular de proteínas glucosiladas que inducen la aparición de factores de crecimiento y el progresivo aumento de la matriz extracelular; todo ello, junto a otras alteraciones que acompañan con frecuencia a la DM, como dislipemia o HTA, entre otras, así como el potencial genético que cada diabético exprese, serán los responsables de una microangiopatía precoz o tardía, leve o grave.

Los capilares retinianos, los glomérulos renales y los vasa nervorum son los territorios microvasculares afectados con mayor expresión clínica y las alteraciones metabólicas inducidas por la hiperglucemia se producen fundamentalmente a través de 4 vías: la vía del poliol, la vía de la formación de productos finales de la glucosilación avanzada (AGE), la vía de la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la vía de la hexosamina.

Estas alteraciones referidas a la hiperglucemia pueden afectar tanto a la DM tipo 1 como a la DM tipo 2, siempre que estén mal controladas metabólicamente. Pero la DM tipo 2, además de ser una enfermedad debida a la alteración del metabolismo hidrocarbonado, es una enfermedad del metabolismo lipídico, caracterizada, fundamentalmente, por un aumento de la concentración plasmática de ácidos grasos libres (AGL) procedentes de la lipólisis mantenida y aumentada de tejido adiposo, en especial, del intraabdominal. También aparecen AGL por la acción de la lipoproteinlipasa

a nivel del endotelio capilar sobre los triglicéridos transportados por la lipoproteínas.

En la actualidad sabemos que incluso moderados aumentos de AGL unidos a la albúmina alteran la estructura y funcionalidad de los proteoglicanos de las células endoteliales y musculares lisas de los vasos de mayor calibre. Ésto produce una disminución de la cantidad relativa y grado de sulfatación de los proteoglicanos tipo heparán-sulfato, lo que se asocia a un aumento de la permeabilidad vascular que deja escapar moléculas como la albúmina. En estudios experimentales, la matriz de las células tratadas con AGL ligados a albúmina mostró una mayor afinidad por moléculas lipoproteicas de baja densidad (LDLc), lo que redundaría en un aumento de la captación de macrófagos que también producen alteraciones en la matriz extracelular. Esta “vía lipídica” habría que tenerla muy en cuenta en el desarrollo de la microangiopatía en el diabético tipo 2 y tendría, probablemente, su expresión clínica inicial en la aparición de microalbuminuria.

En esta disfunción lipoproteica del diabético tipo 2, el aumento de concentración plasmática de AGL y, en especial, aquellos que derivan de la lipólisis intraabdominal, da lugar a aumento de las VLDL que nacen con gran carga de triglicéridos. Ello repercutirá en el metabolismo de VLDL hacia LDL, dando lugar a LDL pequeñas y densas, que son bien conocidas como factores aterógenos. Además, la disminución del catabolismo de las VLDL origina una disminución de la concentración de HDL que se agrava por un aumento de su catabolismo. Pues bien, la presencia de estas lipoproteínas modificadas, junto con el estrés oxidativo antes comentado y otros factores como la edad, sexo masculino, tabaco, HTA y disminución de la síntesis y liberación de NO entre otros, son pilares etiopatogénicos fundamentales de lo que conocemos como disfunción endotelial. La disfunción endotelial es la causa de aumento en plasma de moléculas de adhesión al endotelio, lo que genera conexiones de todo tipo con la aterogénesis de grandes arterias, pero también con la vasculopatía capilar (26).

1.7. MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA

1.7.1 Retinopatía diabética

Una de las complicaciones de la diabetes mellitus es el desarrollo de alteraciones oculares. Entre ellas, la retinopatía diabética (RD) es la más

importante, tanto por su prevalencia como por el importante deterioro visual que conlleva.

En los países industrializados, la RD se ha convertido en la principal causa de deficiencia visual y ceguera entre los 25 y 74 años de edad. Aproximadamente, el 98% de las personas con diabetes juvenil y el 78% de los diabéticos adultos presentan algún tipo de retinopatía en los primeros 15 años después del diagnóstico de DM (30)

El síntoma principal del paciente con RD es la disminución progresiva de la agudeza visual producida por el desarrollo de edema macular; no obstante, en los casos más avanzados de RD se puede producir una disminución brusca de la agudeza visual por hemorragia vítrea o, con menor frecuencia, por desprendimiento de retina traccional. La presencia de signos de RD no es sinónimo de déficit visual, ya que el paciente puede desarrollar estadios avanzados de la misma y permanecer asintomático. Por ello, la detección precoz es fundamental para evitar que las lesiones oculares diagnosticadas en fases avanzadas sean ya irreparables.

Las alteraciones iniciales que ocurren en la retina del paciente diabético son: engrosamiento de la membrana basal, pérdida de pericitos y desaparición de células endoteliales con formación de microaneurismas predominantemente en el lado venoso. La proliferación endotelial y la oclusión capilar en el lado arterial, provoca áreas de isquemia retiniana. Estas lesiones en grado progresivo conformarán las manifestaciones clínicas de la RD.

La RD se divide en: Retinopatía diabética no proliferante, cuando sólo hay cambios microvasculares intraretinianos (microaneurismas, permeabilidad vascular, hemorragias intrarretinianas, exudados duros, manchas algodinosas y anomalías vasculares retinianas). El número y extensión de estos signos determinarán la clasificación de la retinopatía no proliferativa; Retinopatía diabética proliferante en la cual se forman sobre la retina nuevos vasos y tejido fibroso. Esta fase de RD sin un adecuado control, evoluciona a complicaciones oculares graves, como hemorragia vítrea, glaucoma neovascular y desprendimiento de retina traccional.

1.7.2 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una complicación microvascular que aparece en pacientes con diabetes mellitus, definida por un aumento en la excreción urinaria de albúmina y un deterioro progresivo de la tasa de filtración glomerular (TFG).

También es conocida como enfermedad de Kimmelstiel-Wilson.

La ND es un marcador de lesión tisular cuya importancia viene dada porque constituye la principal causa de insuficiencia renal en el mundo occidental y la principal causa de muerte en pacientes con diabetes tipo 1. Se ha demostrado que es, además, un factor que aumenta el riesgo cardiovascular y su mera presencia incrementa tanto los costes de atención al paciente diabético como la duración y el gasto derivado de la hospitalización.

Alrededor de un 20-40% de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2 desarrollan ND (31).

Debido a un incremento en la incidencia de diabetes y a la mayor supervivencia de los pacientes, la prevalencia e incidencia de nefropatía diabética aumentan en la actualidad.

Desde un punto de vista histopatológico, presenta un incremento en el grosor de la membrana basal glomerular, expansión del tejido de sostén glomerular (mesangio), hialinosis glomerular y cambios fibróticos en las arteriolas aferentes y eferentes glomerulares.

La primera evidencia clínica de nefropatía es la presencia de un ligero aumento de albúmina en orina, anomalía que se denomina microalbuminuria, y que representa, a su vez, una clave en el diagnóstico de la ND. Esta fase evolutiva también es conocida como nefropatía incipiente. La microalbuminuria habitualmente acaece 5-15 años después del diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1. En esta fase microalbuminúrica de la historia natural de la ND, si no se interviene, aumenta la excreción urinaria de albúmina a una tasa de un 10-20% por año, hasta que se desarrolla la fase de nefropatía clínica, también conocida como albuminuria clínica o macroalbuminuria, a lo largo de un periodo de 10 a 15 años, con un máximo en la incidencia a los 17 años después del diagnóstico de diabetes de tipo 1. Entre un 25 % a un 45% de los pacientes con diabetes de tipo 1 con microalbuminuria desarrollan macroalbuminuria y sólo después de ésta descende la tasa de filtración glomerular pudiendo aparecer, potencialmente, una enfermedad renal en estadio terminal.

La hipertensión arterial se desarrolla al principio de la fase microalbuminúrica o en la fase de transición de ésta hasta la macroalbuminuria. Una vez desarrollada la fase de nefropatía clínica, si no se interviene terapéuticamente, se va reduciendo de forma progresiva la TFG, hasta que, finalmente, se desarrolla una insuficiencia renal crónica. La progresión hasta la fase de enfermedad renal en estadio terminal es mucho más común en los pacientes con diabetes de tipo 1, un 80% a los 20 años, que en aquellos con diabetes de tipo 2, si bien esta noción hoy día es cuestionada. La insuficiencia renal en estadio terminal se desarrolla en un 50% de los pacientes con diabetes tipo 1 con nefropatía clínica en un plazo de alrededor de 10 años después del comienzo de la albuminuria y en más de un 75% a los 20 años. La duración de la diabetes antes del desarrollo de ND es inferior en la diabetes de tipo 1 que en la de tipo 2 (32).

La Nefropatía diabética no sólo se manifiesta clínicamente por un incremento en la excreción urinaria de albúmina sino también por un descenso progresivo de la TFG. La TFG es el mejor test para medir la función renal y puede ser estimada por diferentes fórmulas (Cockcroft-Gault / MDRD4 /CKD-EPI) (33).

1.7.3 Neuropatía diabética

La Polineuropatía Diabética (PN) es una polineuropatía sensitivo-motora y simétrica debida a la diabetes, que afecta, predominantemente, al segmento distal de los miembros inferiores, y a la que caracterizan la presencia de síntomas sensitivos (positivos) y de déficit (negativos), una variable participación autonómica, y una participación muscular que no suele ser importante.

Tomando como base la historia natural clínica (comienzo, curso, patrón de los nervios afectados y pronóstico), la población de neuronas lesionadas, la anatomía patológica, los mecanismos patogénicos implicados, los factores de riesgo identificados para padecerla y la respuesta a los diferentes tipos de tratamiento, es posible distinguir dos grupos de neuropatías bien diferenciados atribuidos a la diabetes:

- Neuropatías dependientes de la longitud del nervio y de la duración de la diabetes: 1) Polineuropatía Diabética somática y autonómica, 2) Polineuropatía de fibras delgadas.

- Neuropatías independientes de la longitud del nervio y de la duración de la diabetes: 1) Neuropatía oculomotora, 2) Radículo-neuropatía tóracolumbar, 3) Radículo-plexo-neuropatía lumbosacra, 4) Neuropatías por atrapamiento (nervio mediano, cubital, peróneo..), 5) Neuropatía isquémica de los miembros inferiores, 6) Neuropatía hipoglucémica.

También en la última década se han multiplicado las evidencias que implican a la diabetes en la génesis de la demencia de la enfermedad de Alzheimer esporádica. (34)

El grupo de Suzanne de la Monte (35) pero sobre todo el Grupo de Estudio de la Encefalopatía Diabética (Departamento de Neurología en el Instituto de Neurociencia “Rudolf Magnus” y Centro Médico universitario de Utrecht, Holanda) quien viene revisando y estudiando más sistemáticamente las disfunción cognitiva en la diabetes humana (36) , ha logrado hacer aportaciones fundamentales: han estimado la prevalencia de disfunción cognitiva en aproximadamente, el 30% de los diabéticos tipo 2; han identificado dos periodos vitales de riesgo para esa disfunción: comienzo de la diabetes antes de los 7 años

(lógicamente, en la DM tipo 1), y un periodo tardío pasado los 65 años (válido para ambos tipos), cuando se inician los fenómenos degenerativos en el cerebro que envejece; fuera de estos periodos, el deterioro cognitivo tiene lugar en aquellos pacientes con notables complicaciones macro o microvasculares. Ha establecido que la polineuropatía y la encefalopatía no están asociadas ni a nivel cognitivo ni estructural, sugiriendo la existencia de una patogenia distinta para ambas alteraciones. Si bien la mayoría de los pacientes presentan manifestaciones clínicas poco acusadas, dada la elevada prevalencia de la DM, la sombra que se proyecta a nivel poblacional es inquietante.

1.8. MACROANGIOPATÍA DIABÉTICA

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por el depósito de lípidos y elementos celulares en la capa íntima arterial, cuyo crecimiento y complicaciones provocarán, a la larga, la obstrucción de la luz vascular. Su etiología es claramente multifactorial, con tres factores de riesgo fundamentales, hipertensión, dislipemia y tabaquismo, y su evolución lleva a un estado inflamatorio crónico fibroproliferativo en el que participan diversos factores, dependiendo del estadio evolutivo del proceso. Las lesiones producidas por la aterosclerosis son responsables de las enfermedades cardiovasculares (ECV) isquémicas, como infarto agudo de

miocardio o accidentes cerebrovasculares, primera causa de muerte en los países desarrollados.

En el caso particular de la diabetes, a las complicaciones cardiovasculares por aterosclerosis se les atribuye cerca del 75% de los fallecimientos, duplicando lo observado en la población no diabética (37) Los ya clásicos datos del estudio Framingham demostraron que los varones diabéticos duplican el riesgo de fallecer por un accidente cardiovascular y que, en las mujeres diabéticas, dicho riesgo es hasta cuatro veces mayor, comparándolos con poblaciones no diabéticas de la misma edad y sexo (38). Por ello, la diabetes está ahora justamente reconocida como uno de los principales factores independientes de riesgo de ECV.

Es interesante recordar que en los albores de la era insulínica, las complicaciones por aterosclerosis eran responsables de no más del 20% de las muertes en los pacientes diabéticos. Suele decirse, por ello, que la insulina y los antibióticos, al prolongar la vida del diabético, le permiten ahora fallecer por complicaciones ateroscleróticas y que nos encontramos en la era vascular de la diabetes.

Tanto la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) como la tipo 2 (DM2) cursan con una alta prevalencia de complicaciones vasculares. Las que afectan a los pequeños vasos

(microangiopatía diabética) son una consecuencia directa de la hiperglucemia y se presentan pasados unos años del diagnóstico de la diabetes. El control estricto de la hiperglucemia en diabéticos tipo 1 retrasa el comienzo o la progresión de todas las lesiones microangiopáticas.

Las lesiones de los vasos de gruesos y mediano calibre (aterosclerosis o macroangiopatía diabética) afectan, fundamentalmente, a las arterias coronarias, cerebrales, aorta y las de los miembros inferiores. Desde el punto de vista histopatológico, las lesiones ateroscleróticas del paciente diabético tienen un mayor contenido lipídico y más complicaciones trombóticas que las de los no diabéticos. Además, en el diabético, la aterosclerosis es difusa, afecta a un mayor número de vasos y se desarrolla de manera más rápida, extensa y precoz, incidiendo por igual en ambos sexos. Sus principales manifestaciones clínicas son, como en la población no diabética, la cardiopatía coronaria isquémica (CHD), los accidentes vasculares cerebrales y la arteriosclerosis obliterante de las extremidades, con la diferencia de que, en los diabéticos, estas complicaciones aparecen a edades más jóvenes. El riesgo de padecer lesiones ateromatosas de grandes vasos está también elevado en los sujetos con tolerancia anormal a la glucosa, con hiperglucemia asintomática de rango no diabético (fase de

prediabetes), en quienes las complicaciones macrovasculares, especialmente, la CHD, pueden preceder a la aparición de la DM2. De hecho, la prevalencia de CHD entre diabéticos tipo 2 recién diagnosticados puede ser igual o mayor que entre los que ya se saben diabéticos desde hace años (39)

Estos datos han hecho pensar que la diabetes y la aterosclerosis compartirían algunos genes y factores ambientales implicados en los mecanismos aterogénicos, la llamada “hipótesis del terreno común”, y que no siempre es apropiado considerar la aterosclerosis como una complicación secundaria de la diabetes (40).

El dilemma de si existen factores de riesgo aterogénico que sólo se presentan en los pacientes diabéticos o si la diabetes, en realidad, únicamente incrementa y acelera la acción de factores que ya actúan en individuos no diabéticos, está todavía pendiente de aclarar. Es cierto que los principales factores de riesgo cardiovascular en el diabético son, como en el no diabético, las alteraciones del metabolismo lipídico, la hipertensión arterial y el tabaquismo. Además, según los datos del Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) (41), la mortalidad por CHD se eleva exponencialmente en función de la colesterolemia, tanto en diabéticos como en no diabéticos. Sin embargo, para cada valor de colesterolemia los diabéticos tienen tasas de mortalidad entre 3 y 5 veces superiores y lo mismo ocurre también con las cifras de presión arterial.

El hecho de padecer diabetes, por tanto, parece ejercer un efecto independiente y multiplicador sobre la incidencia de la CHD. Diferentes estudios han demostrado que, para un mismo número de factores de riesgo, los diabéticos padecen de 3 a 5 veces más mortalidad cardiovascular que los no diabéticos. Es decir, una parte del exceso de riesgo cardiovascular observado en los diabéticos no puede explicarse por los factores de riesgo tradicionales, lo que obliga a postular otros factores, operantes sólo en los diabéticos.

En la diabetes existen dos posibles factores de riesgo que no se encuentran en la población general: la hiperglucemia y la hiperinsulinemia. La primera es la causante de los fenómenos de glicosilación de las proteínas y del estrés oxidativo, que facilita la oxidación de las LDL y la aterogénesis. La hiperinsulinemia se considera como secundaria, compensadora de un estado de resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y, para algunos, sería el defecto básico responsable del riesgo de padecer DM2 y complicaciones cardiovasculares.

La asociación entre resistencia insulínica e hiperinsulinismo con dislipemia, hipertensión arterial, obesidad visceral y riesgo elevado de DM2 y complicaciones ateroscleróticas, conocida como síndrome metabólico, podría explicar los mecanismos patogénicos comunes. Recordemos que, aproximadamente, el 80% de los diabéticos tipo 2 reúnen criterios diagnósticos de síndrome metabólico.

La glucosilación de proteínas altera la estructura y función de las apolipoproteínas, modificando el metabolismo lipídico. La proporción de glucosilación de las apolipoproteínas es proporcional a la concentración de glucosa en plasma, existiendo una buena correlación entre los valores de glucemia y los de LDL glucosilada. La glucosilación de las VLDL y LDL potencia su capacidad aterógena y tiene repercusiones vasculares nocivas. Las LDL glucosiladas son funcionalmente anormales, con disminución de su afinidad por el receptor LDL y con capacidad inmunogénica, acumulándose en el torrente circulatorio y permitiendo el depósito de ésteres de colesterol en los macrófagos (42).

En las placas de ateroma se han descrito complejos inmunes de LDL glicosiladas, con capacidad citotóxica. Aunque la glicosilación de la apoB de las LDL no suele superar al 25%, es suficiente, sin embargo, para disminuir más de cinco veces el catabolismo de las mismas.

Por otro lado, los AGE (advance glycated end products) intervienen en la aterogénesis del diabético a través de una serie de mecanismos y previa unión a unas proteínas, presentes en las células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos, que actúan como receptores (RAGE). La unión a estos receptores desencadena una serie de reacciones que interfieren con el metabolismo de proteínas y lipoproteínas, alterando su configuración molecular, actividad enzimática y vías catabólicas. La función de las proteínas intracelulares queda afectada, se modifica la matriz extracelular y se altera la acción de las hormonas, citosinas y radicales libres. Consecuencias bien conocidas de estas transformaciones son el aumento de la permeabilidad vascular, la mayor actividad procoagulante, expresión de moléculas de adhesión y entrada de monocitos en la íntima. Así pues, los AGEs, al perturbar gravemente la fisiología de la pared arterial, son responsables en buena medida de la aterosclerosis precoz y difusa del sujeto diabético (43).

Otra consecuencia relevante de la formación de los AGEs es su capacidad para formar fenómenos de entrecruzamiento (cross-linking) con las proteínas, especialmente, el colágeno de la pared arterial. Ésto origina un cambio de las propiedades mecánicas de los tejidos afectados, lo que en el

sistema vascular se traduce en un aumento de la rigidez arterial y disminución de la distensibilidad del miocardio. De esta forma, los AGEs participan también en la génesis de la hipertensión sistólica y de la insuficiencia cardíaca, tan frecuentes en los pacientes diabéticos.

En resumen, la macroangiopatía diabética es una forma de aterosclerosis precoz, difusa y grave, que afecta por igual a los dos sexos, causa numerosas complicaciones vasculares y es la principal responsable de que más del 75% de los diabéticos mueran por enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio o los accidentes cerebrovasculares. Junto con la hipertensión arterial, las alteraciones lipídicas y el tabaquismo existen en el diabético otros factores de riesgo para el desarrollo de las aterosclerosis o macroangiopatía, mayoritariamente relacionados con las desfavorables consecuencias de la hiperglucemia, la inflamación y una tendencia procoagulante

1.8.1 Corazón y diabetes mellitus

La relación entre el corazón y la diabetes mellitus (DM) está hoy en día claramente establecida. En general, la repercusión cardíaca en el corazón podemos establecerla a cinco niveles: 1. Enfermedad arterioesclerosa en general y coronaria. 2. Insuficiencia cardíaca. 3. Arritmias y muerte súbita. 4. Miocardiopatía diabética y 5. Neuropatía autonómica cardiovascular.

Los pacientes con DM, tienen mayor prevalencia de enfermedad coronaria aterosclerótica, más posibilidad de tener un IAM, isquemia miocárdica más extensa, afectación de los tres vasos epicárdicos o del tronco, enfermedad difusa y oclusiones completas.

Los pacientes con DM tipo 2 tienen un riesgo cardiovascular muy elevado de eventos cardíacos (>20% a los 10 años), que se producen unos 15 años antes que en los no diabéticos, alrededor de los 40 años en varones y 48 años en mujeres. En los pacientes con DM-1, dicho riesgo se alcanza alrededor de los 30 años. También tienen mayor incidencia de enfermedad arterioesclerosa asintomática que la población general, demostrada tanto con pruebas anatómicas, (TC, coronariografía) como funcionales, con una mayor incidencia de angina atípica, IAM e isquemia silente y lesiones coronarias de alto riesgo.

1.8.2 Enfermedad cerebrovascular y diabetes mellitus

Hasta 3 veces podría aumentar el riesgo para la enfermedad cerebrovascular en diabéticos, principalmente, en los diabéticos tipo 2, sin que todo se explique por los clásicos factores de riesgo arterioscleróticos cardiovasculares.

Un paciente diabético con enfermedad cerebrovascular arterioesclerótica tiene un riesgo elevado de sufrir un accidente isquémico cerebral agudo, representando entre el 65-75% de todos los ACV, sin que se asocie con un aumento de hemorragia cerebral. El rango de edad de mayor incidencia en DM está entre los 40 y 60 años, siendo la mujer la que más se afecta, también comparada con la población general (44)

La HTA es en el diabético el factor de mayor riesgo, uniéndose a otras manifestaciones como la insuficiencia cardíaca y la fibrilación auricular y con una constante general muy importante: el mal control metabólico, elevación crónica de la HbA1c y dislipemia con aumento de triglicéridos y disminución de HDL.

Del análisis de pacientes y seguimiento de hasta 7.9 años efectuado en el estudio UKPDS, se desprende que un tratamiento intensivo para la HTA y para la fibrilación auricular consigue una reducción llamativa del 44% de todos los AVC (fallecidos y no fallecidos), en comparación con el grupo de pacientes con DM tipo 2 con un control menos favorable de su tensión arterial.

1.8.3 Enfermedad vascular periférica y diabetes mellitus

Si bien , clínicamente, la enfermedad vascular periférica se manifiesta fundamentalmente en las extremidades inferiores, no debe contemplarse como una enfermedad vascular aislada, sino como la expresión local de una macroangiopatía aterosclerótica más o menos generalizada, universal, que afecta también a otros territorios arteriales: cerebrovasculares, coronarias, etc. Es una realidad clínica que los diabéticos que presentan una isquemia arterial en extremidades inferiores están particularmente predispuestos a eventos coronarios o cerebrovasculares. La prevalencia de enfermedad cerebrovascular en pacientes con isquemia arterial periférica se sitúa entre el 25% y el 50%, según las series publicadas, en tanto que la mortalidad por infarto de miocardio en esos pacientes alcanza el 61% en los varones y

el 33% en las mujeres, todo lo cual da idea de la magnitud patológica de la macroangiopatía diabética aterosclerótica (45)

La morbilidad derivada de la enfermedad vascular periférica es muy elevada en los diabéticos. Aproximadamente, más de la mitad de las amputaciones quirúrgicas en extremidades inferiores por causas no traumáticas aparecen en esos enfermos. Cerca de un 75% de los pacientes que sufren claudicación intermitente son diabéticos con una incidencia del 2% / año. Al cabo de 20 años de su diagnóstico, un 50% de los diabéticos tipo 2 presentan esta angiopatía en grado mayor o menor (46) y un 9.9% de los diabéticos tipo 1 tienen úlceras isquémicas en los pies (47).

La afectación del tejido óseo, objetivo fundamental de este trabajo, la revisamos en mayor profundidad en los siguientes apartados.

2. EL TEJIDO ÓSEO

2.1. GENERALIDADES

El hueso es un tejido conectivo especializado que junto con el cartílago, forma el sistema esquelético (48). Este sistema tiene varias funciones:

-Mecánica: proporcionando soporte a la musculatura y permitiendo el movimiento y la locomoción.

-Protectora: resguardando a los órganos vitales y a la médula ósea.

-Metabólica: contribuyendo al mantenimiento adecuado de la homeostasis mineral; sirve de reservorio a minerales, citoquinas y factores de crecimiento. También interviene en la diferenciación y supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas.

-Endocrina: Se sabe que el tejido óseo contribuye a procesos sistémicos, como la regulación renal de fósforo, a través de la producción del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) (49), la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa, a través de la OCN descarboxilada (50 ,51) ; y la espermatogénesis, a través de la producción de testosterona (52). Un compendio de estas acciones aparecen en la Figura 2.1.

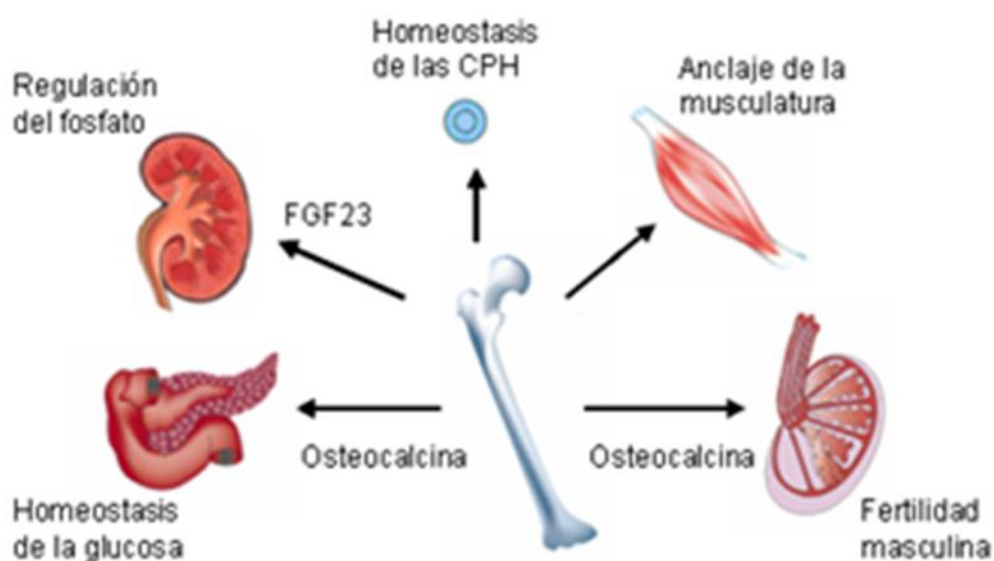


Figura 2.1. Función endocrina del hueso. Adaptado de (123)

El tejido óseo está constituido por las células óseas y la matriz extracelular. Ésta se caracteriza por estar mineralizada (incluye el 99% del calcio del organismo), y presenta la capacidad de regenerarse constantemente a lo largo de la vida como consecuencia de un metabolismo muy activo. Se compone de una matriz orgánica (20-40%), una matriz mineral (50-70%), agua (5-10%) y menos de un 3% de lípidos (48).

2.2. MATRIZ ÓSEA

La matriz ósea determina las propiedades biomecánicas del hueso. La fase orgánica proporciona flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tensión, mientras que la fase mineral proporciona rigidez, dureza y resistencia a la compresión.

La matriz orgánica está compuesta mayoritariamente por fibras colágenas (colágeno tipo I), por proteínas no colágenas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento, proteínas séricas, etc..) proteoglicanos y lípidos. Las moléculas más importantes son:

- Colágeno tipo I (COL 1): es el elemento constructor básico de la red de fibras de la matriz orgánica. Es sintetizado por los osteoblastos en forma de precursores, y se caracteriza por tener unas pequeñas extensiones peptídicas terminales: el propéptido amino-terminal (N terminal) (P1NP) y el propéptido carboxi-terminal (C-terminal) (P1CP). Al degradarse, aparecen unas moléculas llamadas telopéptidos, C-terminal (CTX o beta CrossLaps) y N-terminal (NTX). Tanto el P1NP, como el beta-CrossLaps son utilizados en la práctica clínica como marcadores séricos del remodelado óseo; el P1NP se utiliza como marcador de formación ósea y beta-CrossLaps como marcador de actividad osteoclástica. (53,54,55,56,57).
- Osteocalcina (OCN): también llamada BGP (Bone Gla protein) debido a que posee en su secuencia el ácido gamma-carboxiglutámico (Gla). Se encuentra casi exclusivamente en la matriz ósea y es una de las proteínas más abundantes del hueso, constituyendo hasta un 20% de las proteínas no colágenas presentes en la matriz ósea. Es sintetizada por los osteoblastos.

- Otras proteínas no colágenas son: la osteonectina (glucoproteína SPARC), que es la glucoproteína fosforilada más prevalente en el hueso (2%) y la osteopontina (OPN), que es una proteína que puede mediar en la conexión celular, anclando osteoclastos al hueso, y fijando el calcio con una afinidad muy elevada (58,59).

La matriz inorgánica está compuesta casi en su totalidad por cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, con una pequeña cantidad de fosfato ácido, carbonato y magnesio. Actúa como reserva de iones de calcio, fosfato y magnesio y resulta fundamental en el proceso de la mineralización ósea (60).

2.3. CÉLULAS ÓSEAS

El hueso es un órgano metabólicamente muy activo que está sometido a una renovación continua, consistente en la destrucción del hueso viejo al tiempo que se forma un hueso nuevo para sustituirlo. Este proceso tiene lugar gracias a la existencia de dos líneas celulares bien diferenciadas: (a) células de extirpe osteoblástica, encargadas de la formación del hueso nuevo (formada por los progenitores o células madres mesenquimales, que en estadios sucesivos dan lugar a preosteoblastos, osteoblastos, células de revestimiento y osteocitos) y (b) células de extirpe osteoclástica, encargadas de la destrucción del hueso viejo (células madre hematopoyéticas, que dan lugar a los preosteoclastos y finalmente a los osteoclastos maduros) (61).

Ya que en este trabajo estudiamos las células circulantes de extirpe osteoblástica, nos detendremos en la descripción más pormenorizada de este linaje celular.

2.4. CÉLULAS DE LINAJE OSTEABLÁSTICO: OSTEABLASTOS, CÉLULAS DE REVESTIMIENTO (LINING CELLS), OSTEOCITOS Y OSTEACLASTOS

2.4.1. OSTEABLASTOS

Los osteoblastos (OB) son células de origen mesenquimal, responsables de la creación y el mantenimiento de la arquitectura del esqueleto. Llevan a cabo la producción de las proteínas de la matriz extracelular y de los factores que regulan la mineralización de la misma, tanto en el periodo de la formación ósea, como más tarde, durante el remodelado. Además, los osteoblastos regulan la diferenciación de los osteoclastos y, por ello, la

reabsorción ósea, mediante la secreción de citoquinas o por contacto celular directo (62).

El osteoblasto maduro activo se sitúa en la superficie del hueso. Estas células emiten prolongaciones citoplasmáticas, desde su superficie secretora hacia la matriz osteoide, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos cercanos, con los que se interrelacionan, a menudo, a través de uniones tipo gap. Se ha demostrado que los osteoblastos poseen receptores para la PTH y prostaglandinas, pero no para la calcitonina. También expresan receptores esteroideos para la vitamina D y estrógenos, así como varias moléculas de adhesión (integrinas), citoquinas del sistema RANK-RANKL-OPG y para productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs) (63,64).

Una de las características fenotípicas del osteoblasto es la síntesis de la isoenzima fosfatasa alcalina ósea (FAO). Esta proteína se encuentra fundamentalmente en la membrana basal del osteoblasto y parece tener un importante papel en el proceso de mineralización ósea, interviniendo en la formación de fosfato cálcico (base de la cristalización de la hidroxiapatita) (65). La detección histoquímica de la fosfatasa alcalina (FA) representa uno de los marcadores más tempranos del fenotipo de los osteoblastos.

Los osteoblastos pueden quedarse embebidos en la matriz que han formado (dando lugar a los osteocitos), convertirse en células de revestimiento inactivas o bien activar su mecanismo apoptótico (66).

El proceso celular de la apoptosis en osteoblastos se caracteriza por una pérdida de volumen, colapso del citoesqueleto, fragmentación del núcleo y degradación del ADN, así como la separación de la matriz, señal que les identifica para ser procesados por los fagocitos. Este proceso se controla a través de dos rutas celulares diferentes: una de ellas es iniciada por miembros de la familia de las TNF y la otra está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, que implica la liberación del citocromo C de la mitocondria. Ambas rutas activan una familia de enzimas proteolíticas llamadas caspasas que provocan la escisión de proteínas esenciales para la vida de la célula, provocando la muerte de ésta.

La apoptosis de estas células está modulada por hormonas, factores locales como citoquinas (IL-6), IGF-1, proteínas Wnts y sus antagonistas, la proteína relacionada con la PTH (PTHrP), fuerzas mecánicas y el estrés oxidativo, y representa un mecanismo importante de control funcional, de tal forma que pequeños aumentos en la prevalencia de apoptosis de los

osteoblastos en un sección ósea produce pérdida del tejido óseo vivo y con función normal (67,68,69).

Los osteoblastos maduros producen las proteínas de la matriz, siendo las fundamentales el COL1, la OCN y la FA. Además, en esta etapa de desarrollo celular es cuando los niveles proteicos y de expresión de OPG son los más elevados y se relacionan con la expresión de osteocalcina. Generalmente estos osteoblastos maduros se sitúan en grupo (100-400 células), tapizando una capa de matriz no mineralizada, que acaban de sintetizar (ribete osteoide).

2.4.2 CÉLULAS DE REVESTIMIENTO (LINING CELLS)

Un porcentaje pequeño de los osteoblastos acaban diferenciándose en células de revestimiento, también denominadas “lining cells”. Se localizan recubriendo, en forma de monocapa, la superficie del hueso trabecular o endocortical. Morfológicamente se caracterizan por ser células elongadas, aplanadas, con un moderado desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, y generalmente presentan un núcleo ovoide. Se encuentran íntimamente comunicadas entre sí mediante uniones gap y, además, también presentan comunicación con osteoblastos, osteoclastos y osteocitos a través de los canalículos. Se caracterizan porque conservan la capacidad de rediferenciarse en osteoblastos tras diferentes estímulos mecánicos y/o endocrinos (70).

Sus funciones no están del todo claras, pero se conoce su acción en el sistema de transducción de señales mecano-sensitivas junto a los osteocitos, interviniendo así en el inicio del remodelado óseo (71). Tras las señales de inicio de remodelado emitidas por los osteocitos (apoptosis), las células de revestimiento han de dejar paso a los precursores osteoclásticos. Para ello, estas células forman un dosel por encima de la zona de acción, creando un espacio cerrado denominado “Compartimento de Remodelado Óseo” (CRO). Este dosel se une a los vasos adyacentes para poder atraer y permitir el paso de los precursores osteoclásticos al interior del CRO (72). Según este modelo, una vez finalizado el proceso de remodelado óseo en el CRO, algunas de las células que formaban parte del dosel volverían a su lugar, mientras que otras son sustituidas por algunos de los osteoblastos maduros, que se diferencian en células de revestimiento tras finalizar su función formadora de hueso.

2.4.3 OSTEOCITOS

El osteocito representa la fase final de la diferenciación del osteoblasto. Son las células más abundantes del hueso (90-95%) y las que tienen una vida más prolongada. Presentan una morfología muy característica, con forma estrellada y sitúan su cuerpo celular en las “lagunas osteocíticas”, teniendo numerosas extensiones celulares que proyectan a través de los canalículos; son unas prolongaciones citoplasmáticas finas, a través de las cuales se comunican, mediante uniones gap, con otros osteocitos y con las células de revestimiento de la superficie. La formación de estas uniones es fundamental para la maduración, activación y supervivencia de los osteocitos (73).

Su función principal es dar sostén al hueso, pero también tienen una función mecano-sensitiva, es decir, son células transductoras de señales mecánicas (tensión, compresión, torsión...etc) y una función osteoprotectora. A través de la apoptosis de estas células, en respuesta a la tensión (ya sea fisiológica o excesiva), se pone en marcha el mecanismo de remodelado óseo para prevenir la acumulación de microdaños (74). Además, estas células tienen otras funciones adicionales importantes, como la producción de FGF23, que controla el nivel sérico de fósforo a través de su acción renal (75).

En los últimos años ha cambiado la percepción de estas células. Han pasado de ser consideradas unas células inertes a reconocerlas como unas células metabólicamente muy activas, secretoras y muy sensibles a los estímulos mecánicos, que juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad de osteoblastos y osteoclastos (76). Tanto los osteocitos sanos como los apoptóticos tienen la capacidad de reclutar osteoclastos hacia los lugares de remodelado óseo: Los osteocitos sanos lo hacen a través de la expresión y secreción de cantidades importantes de OPG y RANKL, mayor que la producida por los osteoblastos; y los osteocitos en apoptosis, gracias a la señalización que generan, son capaces de inducir la expresión de RANKL (75).

Estas células expresan en su superficie CD44 (negativo en osteoblastos y células de revestimiento) y tienen una producción muy reducida de fosfatasa alcalina pero elevada de OCN (77). Además, son las células responsables de la producción y secreción de casi la totalidad de la

esclerostina circulante, un antagonista de la vía Wnt y de la vía de señalización de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) (78,79,80).

Esta línea celular proviene de las células madre mesenquimales (MSC), que son unas células pluripotenciales, localizadas fundamentalmente en la médula ósea, aunque también en músculo y tejido adiposo, con capacidad para diferenciarse en una variedad de tejidos como, hueso, cartílago, músculo y adipocitos (81,82)

La diferenciación de las MSC hacia cada línea celular está controlada por numerosas citoquinas, que regulan distintos factores de transcripción. Entre las citoquinas responsables de la diferenciación osteoblástica están, Hedgehogs, BMPs, TGFβ, PTH y WNTs. Un factor fundamental en la diferenciación hacia osteoblastos es Runx2, y la falta de este factor lleva a defectos importantes en el desarrollo óseo por incapacidad de formación de osteoblastos. El Runx2 interactúa con otras proteínas reguladoras para dar lugar a la expresión de genes específicos del osteoblasto como Col1, fosfatasa alcalina, osteopontina, osteonectina y osteocalcina. El Runx2 regula, además, la expresión del factor de transcripción Osterix, también fundamental para la formación y diferenciación osteoblástica. Osterix puede interactuar con el factor nuclear de células T activadas-2 (NFAT2), controlando la transcripción de genes específicos como osteocalcina, osteopontina, osteonectina y Col1(83-85) (Figura 2.2).

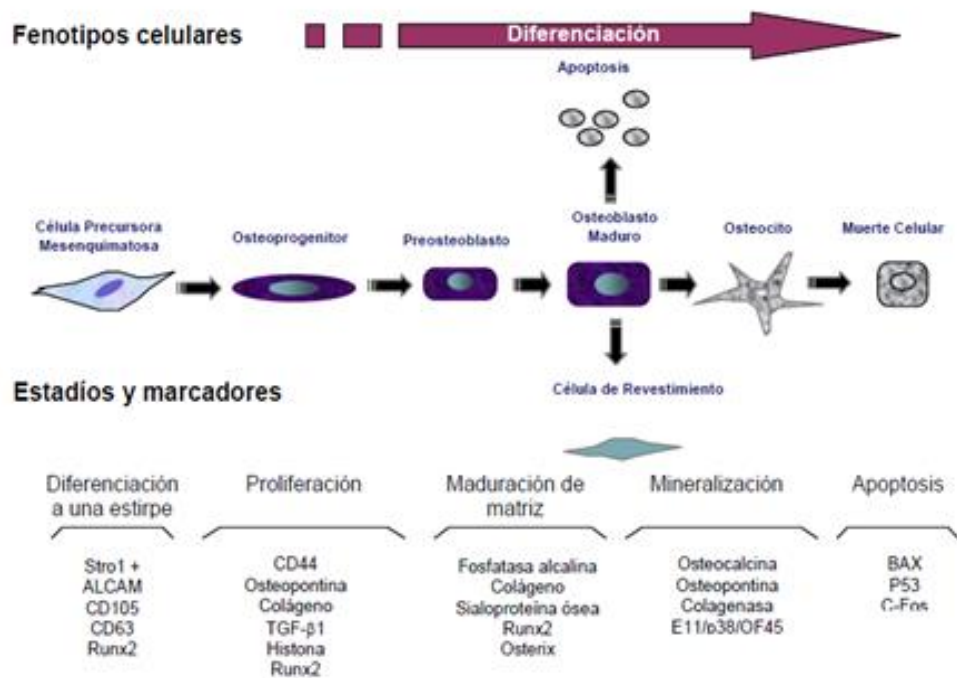


Figura 2.2. Proceso de diferenciación de los distintos estadios de células de estirpe osteoblástica a partir de las células precursoras mesenquimales (85).

Uno de las vías más importantes involucradas en la regulación de la homeostasis ósea es la denominada vía de las proteínas WNTs. En los animales superiores existen 19 proteínas WNTs, que se unen a receptores que existen formando complejos en la superficie celular e inducen una cascada de señalizaciones celulares muy importantes que llegan al núcleo y estimulan la expresión de genes específicos de cada tipo celular. La vía de las proteínas Wnt funcionan en todas las células de estirpe osteoblástica (células progenitoras mesenquimales, preosteoblastos, osteoblastos maduros y osteocitos). (86,87,88,89)

Las proteínas WNTs son glicoproteínas, ricas en cisteínas, que pueden activar vías dependientes de la beta-catenina (vía canónica) o señales independientes de la misma. En la vía canónica, las proteínas WNT activan el complejo receptor del que forma parte LRP5/6 que estabiliza a la beta catenina citosólica, induciendo una traslocación al núcleo a fin de activar genes funcionales específicos. (Figura 3.1).

La importancia de la vía canónica en la homeostasis del esqueleto se ha comprobado por el hecho de que, en humanos, la existencia de mutaciones que llevan a pérdida o ganancia de función del LRP5 resulta en enfermedades del esqueleto, caracterizadas por baja o elevada masa ósea respectivamente y que mutaciones en la esclerostina, un inhibidor de esta vía, causa esclerostosis y la enfermedad de van Buchem, caracterizadas ambas una masa ósea muy elevada. (90,91,92,93)

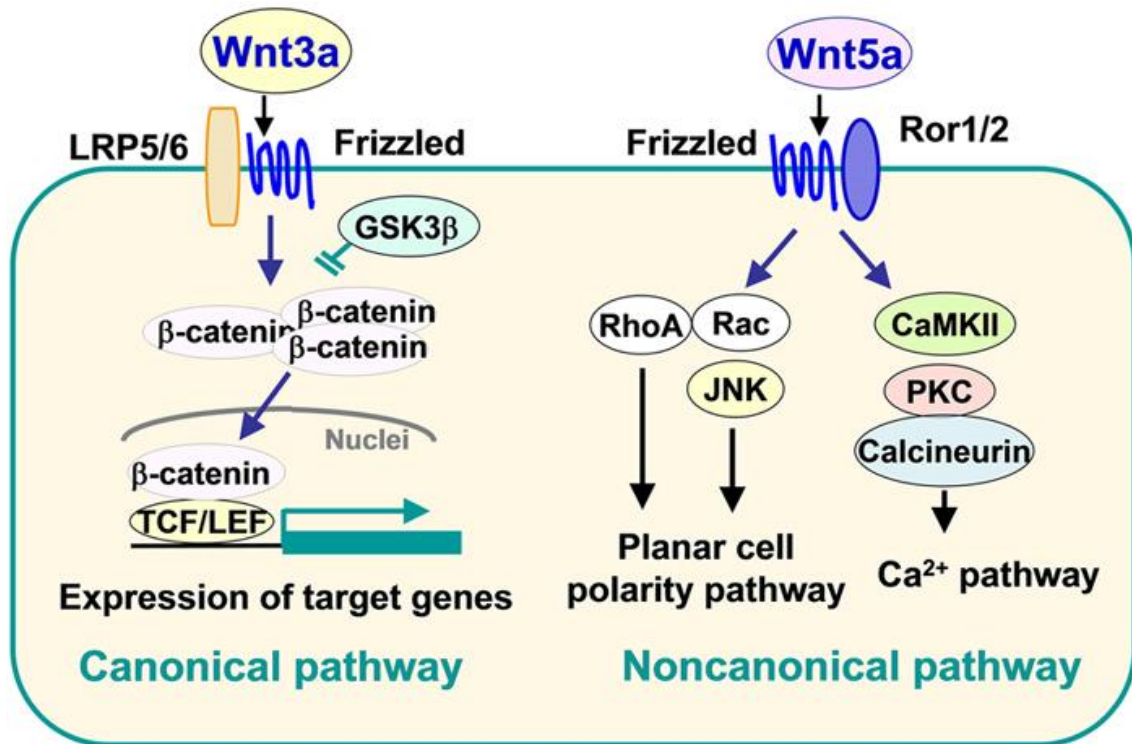
La función de la vía no canónica resulta menos conocida en el hueso (86). Merece la pena reseñar el descubrimiento más reciente de la importancia de la proteína WNT16 en la regulación de la masa ósea cortical y la resistencia ósea, siendo su gen selectivamente expresado en hueso cortical y periostio.

Los estudios existentes sugieren que el WNT16 está fuertemente asociado con el grosor de la cortical y la susceptibilidad de las fracturas en humanos, ya que regula el grosor de la cortical ósea, inhibiendo la resorción endocortical. Observaciones recientes apoyan la hipótesis que la homeostasis del hueso trabecular y del hueso cortical están regulados de forma diferenciada. Existen hallazgos en ratones que demuestran que la delección del WNT16 hace que se produzcan fracturas espontáneas como resultado de la disminución del grosor y aumento de la porosidad cortical, sin afectación alguna del hueso trabecular (94).

Wnt 16 se produce en los osteoblastos y, tanto en ratones como en humanos, inhibe la osteoclastogénesis por dos mecanismos diferenciados: 1.- Directamente actuando sobre los precursores de los osteoclastos; 2.- Indirectamente, aumentando la expresión de OPG en los osteoblastos. Su acción la realiza activando la vía “no-canónica” en los precursores de OCs, mientras que en OBs se activan ambas vías (canónica y no-canónica)(Figura 2.3).

Estos hallazgos abre muchas posibilidades de estudio para comprender mejor el metabolismo diferente de los dos tipos de hueso (cortical y trabecular). Este mejor conocimiento llevará, sin duda, a terapias más útiles y específicas de las fracturas no vertebrales que se producen en lugares con mayor cantidad de hueso cortical, y que son más resistentes a la terapia actual (95)

Figura 2.3



Vías de señalización de las proteínas WNTs (canónica y no canónica). Adaptado de (95)

2.4.4 OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos se caracterizan morfológicamente porque son células multinucleadas y de mayor tamaño que los osteoblastos.

Las células precursoras osteoclásticas proceden de células madre hematopoyéticas (CPH) diferenciadas a células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM). El reclutamiento y proliferación de estas células es activada fundamentalmente por dos citoquinas: RANKL y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Ambas moléculas son producidas por las células estromales de la médula y por las células de estirpe osteoblástica derivadas de ellas, por lo que el reclutamiento de preosteoclastos a partir de precursores mononucleares necesita de la presencia de estas células no hematopoyéticas residentes en el hueso. En el reclutamiento de los preosteoclastos a partir de las CFU-GM parecen intervenir también otras citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-11. Los preosteoclastos son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y se fusionan entre sí para dar lugar a unas células grandes y polinucleadas, que son los osteoclastos maduros. Los

preosteoclastos de la médula ósea pueden dar lugar por fusión a los osteoclastos que remodelan el propio hueso esponjoso medular, o pasar a la circulación (96) (Figura 2.4).

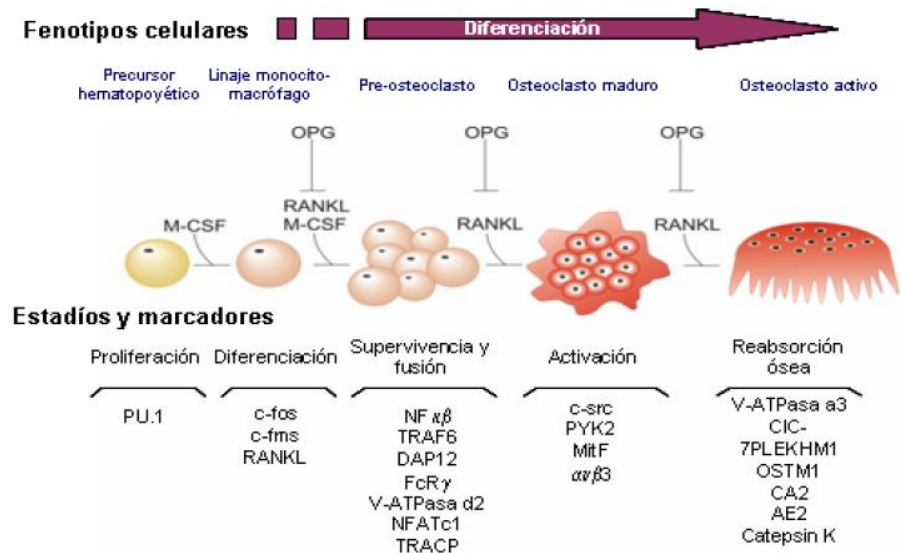


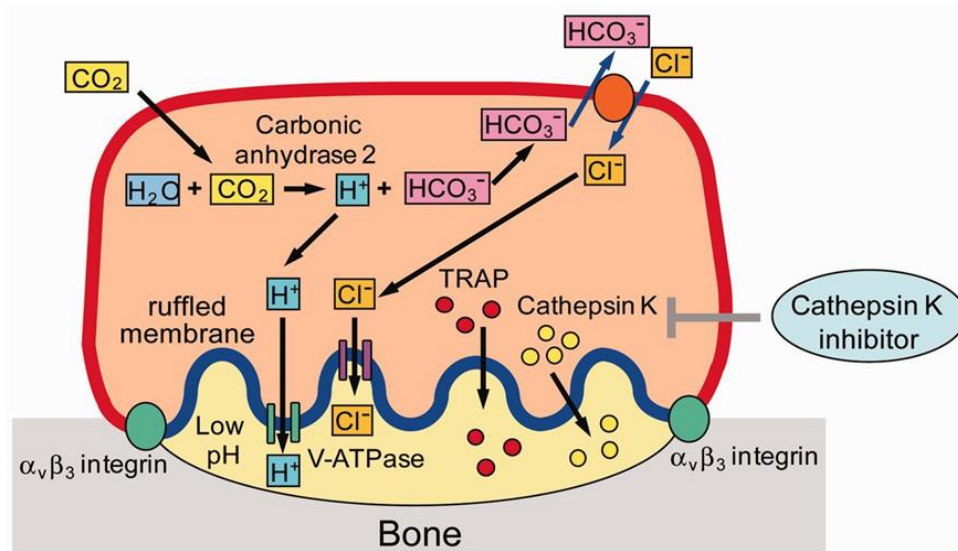
Figura 2.4. Osteoclastogénesis. Adaptado de (96).

La función principal de los osteoclastos es la de reabsorber el hueso. Para ello los osteoclastos entran en contacto con la matriz ósea a través de su membrana basal y estabilizan el contacto uniéndose a la vitronectina de la matriz (97,98). Esta unión crea un espacio sellado debajo del osteoclasto, llamado laguna de resorción o de Howship, que posibilita el ambiente necesario para la resorción ósea. En el interior de esta laguna, los osteoclastos secretan una gran variedad de enzimas lisosomales. Además, con el fin de acidificar el ambiente en la laguna de resorción, son liberados protones gracias a bombas ATPasa/H⁺(99). El PH ácido es necesario para disolver los cristales de hidroxapatita y así poder descalcificar la matriz ósea, además de optimizar el funcionamiento de las enzimas encargadas de la degradación de la matriz (100).

De manera paralela a la secreción de las enzimas necesarias para la degradación de la matriz ósea, los osteoclastos también reabsorben los productos de la digestión de la matriz ósea (101,102). Para ello, tienen una muy buena organización vesicular (103) y los productos de la resorción son procesados en compartimentos ácidos intracelulares. Finalmente, éstos, y probablemente las enzimas responsables de ellos (incluida la catepsina K), son transportados por transcitosis y secretados al espacio paracelular para

acabar en el sistema circulatorio, pudiendo ser eliminados, al menos en parte, a través de la orina (104,105) (Figura 2,5).

Osteoclasto maduro y su función resortiva, resaltando la anhidrasa carbónica, TRAP y catepsina K.



Kikuta J., and Ishii M Rheumatology 2013;52:226-234

Figura 2.5. Función resortiva del osteoclasto maduro.

El osteoclasto es una célula móvil que, tras realizar su actividad resortiva en la laguna, se desplaza a través de la superficie del hueso para reabsorber en otro lugar. No se conocen bien ni el proceso de finalización de su actividad resortiva ni el destino final de los osteoclastos, pero se cree que podría migrar a la médula y allí entrar en fase de apoptosis, una vez finalizada su función.

3. REMODELADO ÓSEO

3.1 CONCEPTO

A lo largo del periodo de crecimiento y desarrollo del ser vivo, el hueso está sometido a un proceso continuo de modelado mediante el cual crece y se desarrolla, cambiando de forma y volumen, adaptándose a las necesidades mecánicas a las que está sometido. Una vez finalizado el crecimiento esquelético, el hueso continúa siendo un tejido metabólicamente muy activo, gracias al proceso del remodelado que se

lleva a cabo en pequeñas áreas, gracias al cual, el hueso viejo es sustituido por hueso nuevo sin presentar cambios estructurales.

El remodelado se inicia en una pequeña zona del hueso denominada “unidad de remodelado óseo” (URO), que se encuentra en reposo. Cada URO está constituida por un grupo de células, principalmente células de revestimiento, osteoclastos y osteoblastos, que llevan a cabo, de manera secuencial, la resorción y la formación ósea. Este proceso (Figura 3.1), que puede durar de 4 a 6 meses, ocurre en cuatro fases:

- **Activación:** El hueso en reposo se activa con una serie de “señales”, como son las producidas por cambios en la situación endocrinológica del individuo, cambios en el ambiente paracrino del lugar que va a ser remodelado, cambios en las fuerzas mecánicas locales y/o cambios en la estructura como consecuencia del envejecimiento o de daño tisular. Estas señales inducen el reclutamiento y activación de un grupo de precursores osteoclásticos de la circulación, a un lugar determinado del esqueleto (106).
- **Resorción:** los osteoclastos maduros se unen a la matriz ósea y comienzan el proceso de la resorción. En este punto, los osteoclastos se anclan a la matriz y forman la laguna de resorción o de Howship, donde liberan H^+ , Cl^- y enzimas lisosomales, que degradan los componentes de la matriz. Finalmente los osteoclastos desaparecen por apoptosis.
- **Inversión:** una vez finalizada la resorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por la presencia de unos cuantos fagocitos mononucleares que, además de limpiar la cavidad, forman la línea de cementación sobre la cual se depositará el hueso nuevo. Durante esta fase tiene lugar el reclutamiento de los precursores osteoblásticos, produciéndose así el fenómeno conocido como “acoplamiento” (“coupling”) entre los osteoclastos y los osteoblastos (107).
- **Formación:** Esta acción es llevada a cabo por los osteoblastos maduros y consiste en la síntesis del componente orgánico de la matriz ósea, así como la mineralización de ésta. Finalmente, la mayoría de estos osteoblastos mueren por apoptosis (50-70%), mientras que algunos quedan embebidos en la matriz (son los que se transforman en osteocitos, de vida muy prolongada) y otros se diferencian hacia células de revestimiento (108).

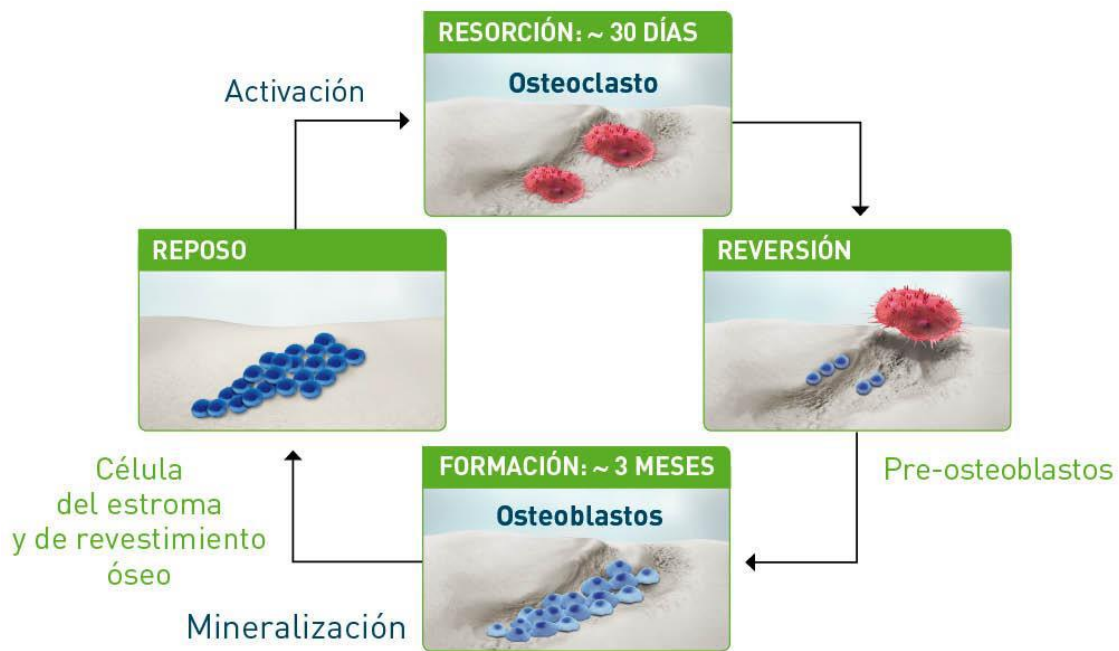


Figura 3.1. Ilustración de las fases del ciclo de renovación ósea (imagen cedida por Amgen y modificada).

Las UROs renuevan en un año el 3-4% del hueso cortical y un 25-30% del hueso trabecular. En un momento dado, pueden estar activas 1.5 - 2 millones de unidades, en distintos lugares del esqueleto y en momentos funcionales diversos. (109).

En condiciones normales, debe existir un equilibrio entre el hueso destruido y el formado. Un desequilibrio entre ambos procesos, lo que sucede progresivamente durante las últimas décadas de la vida o por padecer alguna enfermedad con influencia sobre el metabolismo óseo, condiciona una pérdida de masa ósea como resultado de un exceso de la reabsorción y/o un defecto de la formación.

3.2 REGULACIÓN

Se requieren muchos sistemas reguladores, tanto sistémicos como locales, para mantener un equilibrio adecuado entre los procesos de resorción y de formación ósea (110) (Figura 3.2) y cualquier alteración en dicho balance puede conducir a la aparición de enfermedades metabólicas óseas, como osteoporosis y osteopetrosis (111). Algunos de estos factores promueven la

formación ósea mientras que otros favorecen su reabsorción. La acción combinada de estos dos tipos de factores es la que determina la homeostasis en el tejido óseo.

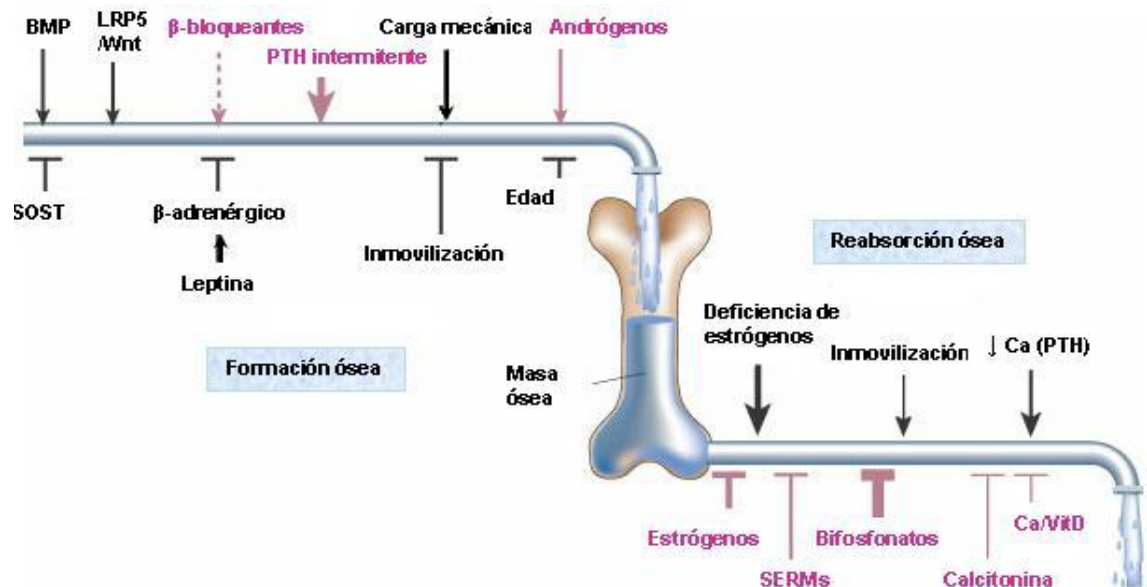


Figura 3.2. Homeostasis ósea. En negro se indican los factores fisiológicos y en rosa, los farmacológicos, que pueden estimular o inhibir la formación y la reabsorción ósea (112).

3.3 SISTÉMICA

La regulación sistémica está producida por diferentes factores hormonales tales como:

- Hormonas calciotropas (PTH, calcitriol o 1,25(OH)₂ Vitamina D y calcitonina)
- Hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos)
- Hormona tiroidea
- Glucocorticoides
- Hormona de crecimiento
- Insulina
- Leptina
- Adiponectina
- Prostaglandinas

La hormona paratiroidea (PTH) es una hormona producida casi exclusivamente por las glándulas paratiroideas en respuesta a bajos niveles

de calcio sérico. La PTH estimula in vitro e in vivo tanto la formación como la reabsorción ósea, según se administre de forma intermitente o continua (113). Se cree que su acción en el remodelado óseo se produce de forma indirecta, pues actúa sobre los osteoblastos incrementando los niveles de RANKL, produciendo así un aumento en el número y actividad de los osteoclastos (114). Tiene, además, una acción estimulante de la actividad osteoblástica, ya que inhibe la producción y secreción de esclerostina por los osteocitos. (La esclerostina es un fuerte inhibidor de la vía Wnt)

La proteína relacionada con la paratohormona (PTHrP) estimula, de manera similar a la PTH, el remodelado óseo, con aumentos de la actividad osteoblástica y osteoclástica.

La 1,25-dihidroxitamina D₃ o calcitriol, metabolito activo de la vitamina D, posee receptores en los osteoblastos (VDR), donde promueven su diferenciación y regula la producción de proteínas tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina (115). También induce el aumento de RANKL en las membranas celulares, promoviendo la proliferación y fusión de los precursores osteoclasticos. Así, el calcitriol regula tanto la formación como la resorción ósea (116).

El déficit de vitamina D (niveles séricos de 25(OH) D < 15 ng/ml) induce un hiperparatiroidismo secundario, que conduce a una osteoporosis. Una deficiencia severa y prolongada de vitamina D (niveles < 10 ng/ml) conduce a la disminución de la mineralización de la matriz ósea y, por tanto, a la producción de raquitismo u osteomalacia (117,118).

La calcitonina inhibe la resorción ósea de forma transitoria uniéndose a su receptor en la membrana del osteoclasto (119).

Las hormonas sexuales esteroideas, principalmente estrógenos y andrógenos, son cruciales en la formación esquelética del individuo en crecimiento, ya que tanto los osteoblastos como los osteoclastos poseen receptores para ellas (120,118). Los andrógenos tienden a favorecer la proliferación de los precursores osteoblásticos y la producción de factores de crecimiento como IGF-1. Y tanto andrógenos como estrógenos inhiben la apoptosis de los osteoblastos. Además, disminuyen la reabsorción debido a la tendencia de estas hormonas a inhibir la producción de factores resorptivos (IL-1, IL-6, IL-7, IL-11 y TNF) al tiempo que estimulan la síntesis de OPG (121).

El descenso drástico de niveles fisiológicos de estrógenos tras la menopausia es causante directo de la osteoporosis postmenopáusica, ya que provoca un rápido aumento en la reabsorción ósea. Este descenso hormonal

parece estar también correlacionado con el aumento que se produce de PTH sérica asociado a esta etapa de la vida y que, como ya hemos mencionado, es capaz por sí solo de aumentar la reabsorción ósea (118).

Los glucocorticoides inhiben la formación de osteoclastos in vitro e inhiben la reabsorción ósea osteoclástica. Los corticoides afectan a la fase de formación ósea a varios niveles: disminuyen la replicación y la acción de las células de linaje osteoblástico y alteran la síntesis de la matriz ósea. Durante el tratamiento con corticoides se describen una menor aposición mineral, reducción del grosor trabecular y disminución de la matriz osteoide. Además, hay un incremento de la superficie de erosión y, probablemente, del número de osteoclastos (121).

Las hormonas tiroideas son necesarias para el reclutamiento, la maduración y la actividad de los osteoblastos y osteoclastos. Actúan directamente sobre las células óseas, modulan el proceso de remodelado e inducen cambios secundarios en las concentraciones de calcio, PTH y vitamina D (121). Los niveles elevados de hormonas tiroideas son un factor de riesgo importante de osteoporosis por remodelado alto, lo que no hay que olvidar en la práctica clínica diaria. En contraposición, bajos niveles de estas hormonas (hipotiroidismo) en adultos resulta en una tasa de recambio óseo reducida con la formación y reabsorción ósea mermadas.

La hormona de crecimiento (GH) estimula el crecimiento longitudinal óseo en la fase de desarrollo. Se han descrito efectos directos de la GH sobre células óseas tras esta fase, pero la mayor parte de sus efectos biológicos son mediados por el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1).

La insulina es una hormona producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, en respuesta a un incremento de la glucosa en sangre tras la ingesta de alimentos, y es considerada como un regulador central de la homeostasis energética (122). con hipoglucemia.

Los osteoblastos poseen receptores insulínicos funcionales (Figura 3.3) y responden a la insulina exógena aumentando los niveles de marcadores anabólicos óseos, incluyendo la síntesis de colágeno, producción de fosfatasa alcalina y el consumo de glucosa. La relación osteoblasto-insulina se ejerce en una doble dirección, ya que además del hecho comentado de que la insulina tiene un efecto anabólico sobre los osteoblastos, estas células (OBs) regulan la secreción y la sensibilidad periférica a la misma.

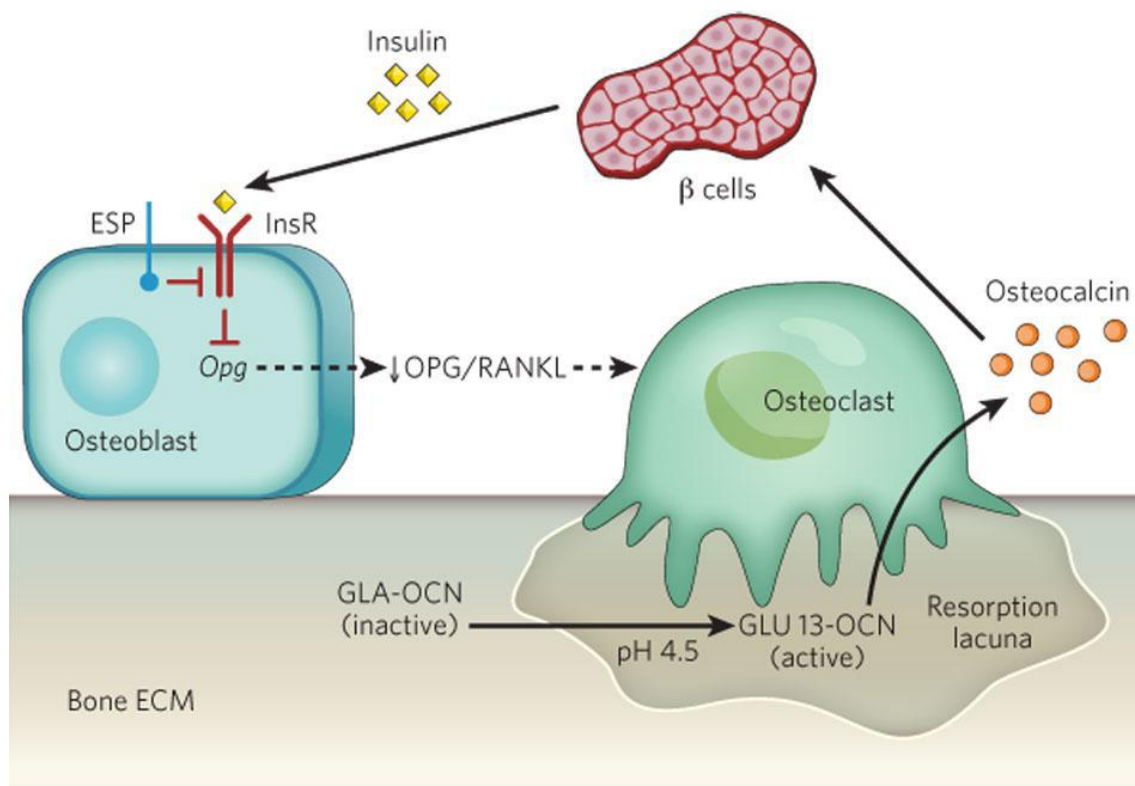


Figura 3.3. Regulación entre insulina, resorción ósea y la actividad de la osteocalcina (OCN). ECM: matriz extracelular; ESP: tirosina fosfatasa; Ins R: receptor de insulina. (123)

En efecto, la insulina se une a sus receptores específicos en el osteoblasto y estimula la producción de osteocalcina, que se decarboxila cuando, por la acción de los osteoclastos, disminuye el PH de la matriz ósea. La osteocalcina decarboxilada es capaz de estimular la formación y secreción de insulina por las células beta del páncreas, al mismo tiempo que aumenta la sensibilidad a la misma en los tejidos periféricos como el músculo y el hígado.

Queda claro, por tanto, la interrelación entre el metabolismo hidrocarbonado y el metabolismo óseo en la doble dirección aquí señalada, lo que ayuda a comprender la alteración del metabolismo óseo, con disminución de formación, que se produce en la diabetes mellitus (124,125).

La leptina es una adipocina secretada por las células del tejido graso que de manera indirecta, vía hipotalámica, estimula los receptores beta 2 adrenérgicos del osteoblasto (126), lo cual induce un descenso en su proliferación y una disminución de la formación ósea. De manera directa, se describe un efecto contrario sobre estas células. La leptina también mejora la sensibilidad a la insulina, en parte mediado por la proteína transportadora tipo 2 de IGF (IGFBP2), y esto puede contribuir también a un efecto positivo sobre el remodelado óseo.

La adiponectina es otra adipocina que se libera del tejido graso subcutáneo, visceral y de la médula ósea, y mejora, como la leptina, la sensibilidad tisular a la insulina, mejorando el metabolismo energético. Se han encontrado receptores para esta hormona a nivel osteoblástico, sobre los que estimula la proliferación, diferenciación y mineralización (127, 128).

Las prostaglandinas (PGE2) tienen múltiples y complejos efectos sobre los osteoclastos, dependiendo de la especie. Se relacionan con el aumento de resorción ósea e hipercalcemia asociados al cáncer e inflamación crónica (129), pero sus efectos globales sobre la resorción ósea en humanos no se conocen, aún, en profundidad.

3.4 LOCALES

La regulación local está producida por numerosos factores que pueden ser liberados por las propias células óseas, sanguíneas (monocitos y linfocitos) y de la médula ósea, incluidas las del estroma medular. Su síntesis está regulada tanto por las hormonas calciotropas y estrógenos, como por elementos de la matriz ósea liberados durante la resorción, como los fragmentos del colágeno. Estos factores pueden ser:

- Factores mecánicos: El remodelado óseo se estimula por las propias fuerzas que actúan sobre el hueso. Las trabéculas óseas se disponen siguiendo la dirección de la máxima tracción y presión. Se ha postulado que las células óseas, especialmente los osteocitos, se comportan como auténticos mecanorreceptores.

- Factores humorales: Estos factores son numerosos y constituyen un entramado funcional, en el que unos determinan o modifican la acción de otros (130). En el desarrollo de los osteoclastos se ven implicados citoquinas y factores estimuladores de colonias: interleuquinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulador de las colonias de monocitos-macrófagos (M-CSF) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Entre los factores estimuladores de los osteoblastos se incluyen el factor transformante beta (TGF-beta), las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II). El TGF-beta también inhibe la apoptosis osteoblástica.

3.5 SISTEMA RANK/RANKL/OPG

Constituye un sistema fundamental y necesario para el remodelado del tejido óseo, con un equilibrio muy estrecho entre los procesos de formación y resorción. Se compone de tres moléculas: el ligando del receptor activador del factor nuclear KappBeta (RANKL), su receptor natural (RANK) y la osteoprotegerina (OPG), que actúa como receptor señuelo de RANKL.

RANKL es una proteína expresada por los osteoblastos y sus precursores bajo el control de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento pro-resortivos, pudiendo permanecer unido a la membrana celular (forma transmembrana) o bien ser expulsado de la célula (forma soluble). RANKL se une a su receptor, RANK, en la superficie de la membrana de los osteoclastos y sus precursores (131). Esta unión produce una cascada de señalización que estimula la fusión de los preosteoclastos, promueve la adherencia de los osteoclastos al hueso, activa su función y aumenta su supervivencia (132). Para regular el equilibrio entre la formación y la resorción ósea, la interacción RANK-RANKL es inhibida por la OPG, proteína producida por los osteoblastos y células del estroma, que funciona en este sistema como un receptor señuelo, uniéndose a RANKL e

impidiendo la unión RANKL-RANK, lo que produce una disminución del número de osteoclastos y aumento de su apoptosis (132) (Figura 3.4).

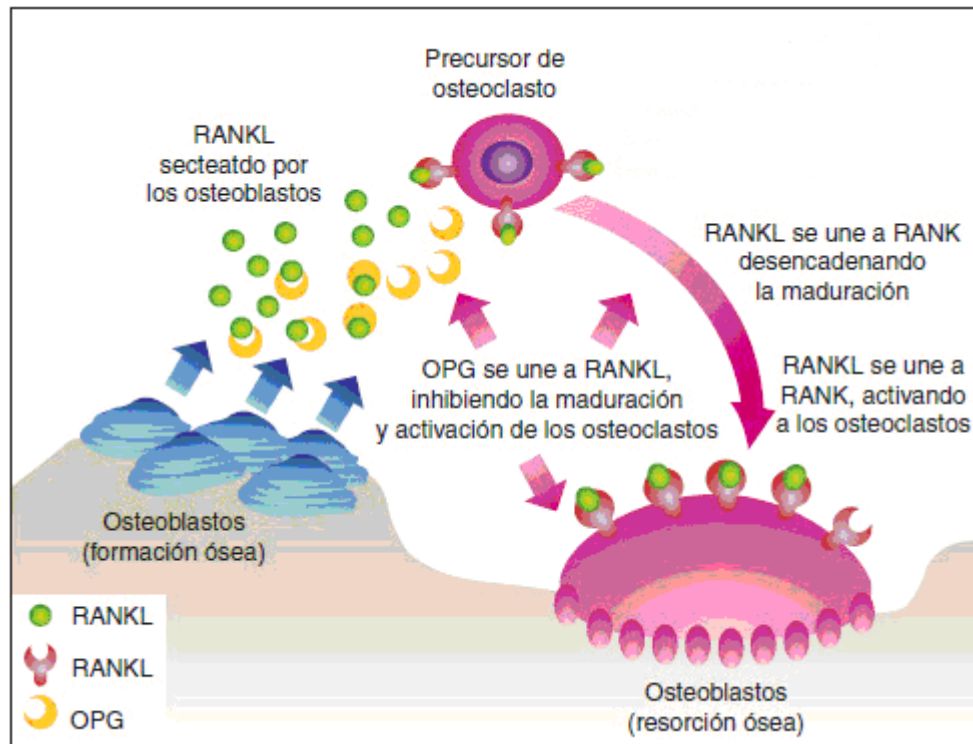


Figura 3.4. Ilustración de la actividad del sistema RANK/RANKL/OPG. Adaptada de (133).

La relación entre ambas proteínas (ratio RANKL/OPG) determina la actividad osteoclástica y el nivel de reabsorción ósea.

La expresión RANKL y OPG está regulada por numerosos factores comunes, entre los que se encuentran algunas hormonas (glucocorticoides, PTH, vitamina D, estrógeno), citoquinas (TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-11, e IL-17), y varios factores de transcripción (Runx2, PPARgamma, IHH) (134).

OPG/RANK/RANKL es el principal sistema de intercomunicación entre células de estirpe osteoclástica y osteoblástica, a través del cual actúan gran parte de las citoquinas, factores de crecimiento y medicamentos que influyen en el remodelado óseo (135). El exceso de RANKL-RANK ha sido relacionado con la patogénesis de la osteoporosis posmenopáusia, artritis reumatoide, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal, tumores óseos benignos y malignos, metástasis óseas e hipercalcemia, mientras que la administración de OPG a modelos animales ha demostrado prevenir o mitigar estos desórdenes. RANKL y OPG son también importantes reguladores de la calcificación vascular y del desarrollo de las glándulas

mamarias durante el embarazo, indicando así el importante papel que desempeña este sistema en el manejo del calcio extraesquelético (136).

Su descubrimiento, la caracterización de sus componentes y sus funciones cambiaron nuestros conceptos previos del metabolismo óseo, permitiendo entender con mucho más detalle la patogénesis de multitud de enfermedades metabólicas óseas y sentar las bases para terapias innovadoras (137).

Un esquema de la relación osteoblasto-osteoclasto a través del sistema OPG/RANK/RANKL y su regulación se encuentra reflejado en la Figura 3.5.

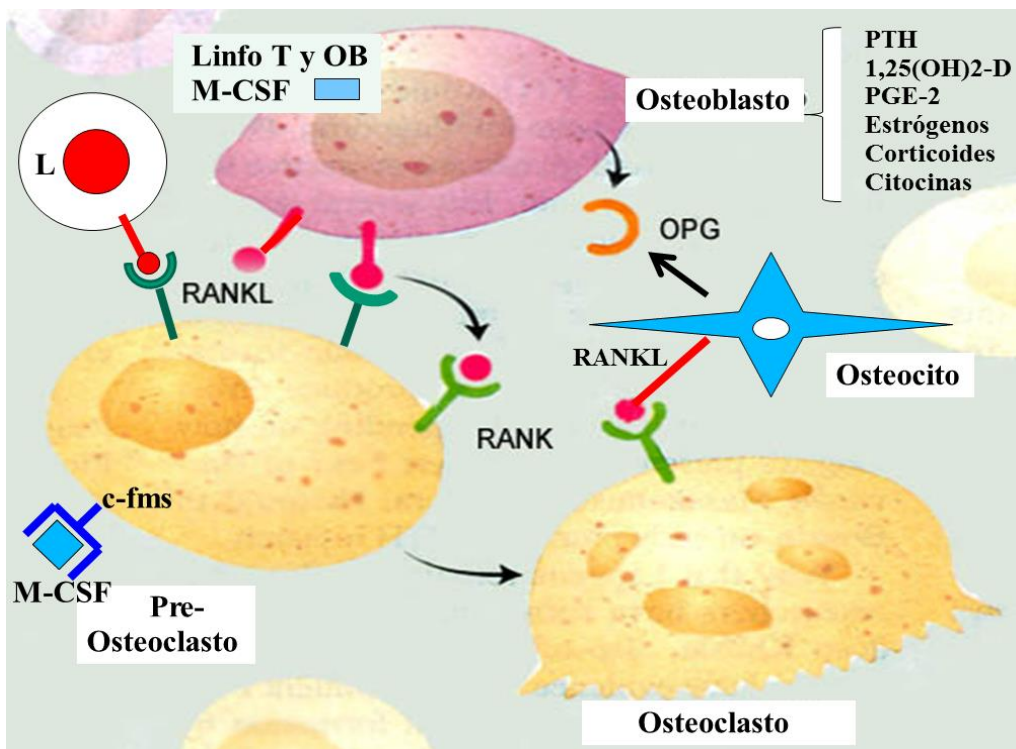


Figura 3.5. Sistema OPG/RANK / RANKL. Adaptado de (138).

3.6. RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA – BETA (RANK).

En humanos el gen que codifica para la proteína RANK se encuentra en la región q22.1 del cromosoma 18 y consta de 10 exones (139-140).

Este receptor está compuesto de 616 aminoácidos, con un péptido señal de 28 aminoácidos, un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana corto de 21 aminoácidos y un gran dominio citoplasmático C-terminal (139). Su ARNm expresa principalmente en células de la estirpe monocítica-macrófaga, incluyendo preosteoclastos, células T y B, células dendríticas y fibroblastos (141,142).

Su activación conlleva no sólo una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios fundamentales para su activación, movilidad y posicionamiento en la superficie ósea a resorber (143), sino que también desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro (144). Los experimentos con animales RANK knock-out dieron como resultados ratones con osteopetrosis severa, con características radiológicas e histológicas del tejido óseo casi idénticas a las de los ratones RANKL knock-out (145,146). Además de la ausencia total de osteoclastos y de nódulos linfáticos, estos ratones desarrollaban hipocalcemia e hipofosfatemia, con marcados niveles de PTH.

La expresión de RANK es promovida por CD40 en células dendríticas y por IL-4 y TGF-beta en células T, pero aún no se conoce con exactitud su regulación en osteoclastos.

3.7. LIGANDO DEL RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR $\kappa\beta$ (RANKL)

El gen que codifica para RANKL en humanos se localiza en la región q14 del cromosoma 13 y consta de 5 exones. Dicha proteína consta de 316 aminoácidos y posee alrededor de un 30% de homología con el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y con CD40, y un 20% de homología con Fas ligando (136). Es miembro de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (TNF) y aparece en dos formas: bien anclado a membrana de osteoblastos, células del estroma, células inmaduras mesenquimales de los bordes del cartílago y condrocitos hipertróficos, o bien de forma soluble (Lum). Su ARNm se expresa no sólo en tejido óseo, sino en médula ósea y tejidos linfáticos (135,141,144, 147).

Su papel principal en el hueso es la estimulación de la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de su apoptosis (135,148,149). RANKL y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), son los

dos factores necesarios y suficientes para completar todo el ciclo de maduración de los osteoclastos a partir de sus precursores inmaduros.

En experimentos con ratones RANKL knock-out se demostró que la ausencia de esta molécula provocaba osteopetrosis severa, acompañada de no sólo defectos en la erupción dental (141) sino también de una falta total de nódulos linfáticos, defectos en la diferenciación de células T y B, y fallos en la formación de estructuras lóbulo-alveolares mamarias durante el embarazo (150). Asimismo, la administración de RANKL en ratones induce la resorción ósea (151), demostrando la importancia de esta molécula en el proceso de remodelado óseo.

Un compendio de las distintas señales y factores de transcripción implicados en la osteoclastogénesis, a partir del estímulo de RANKL está recogido en la Figura 3.6.

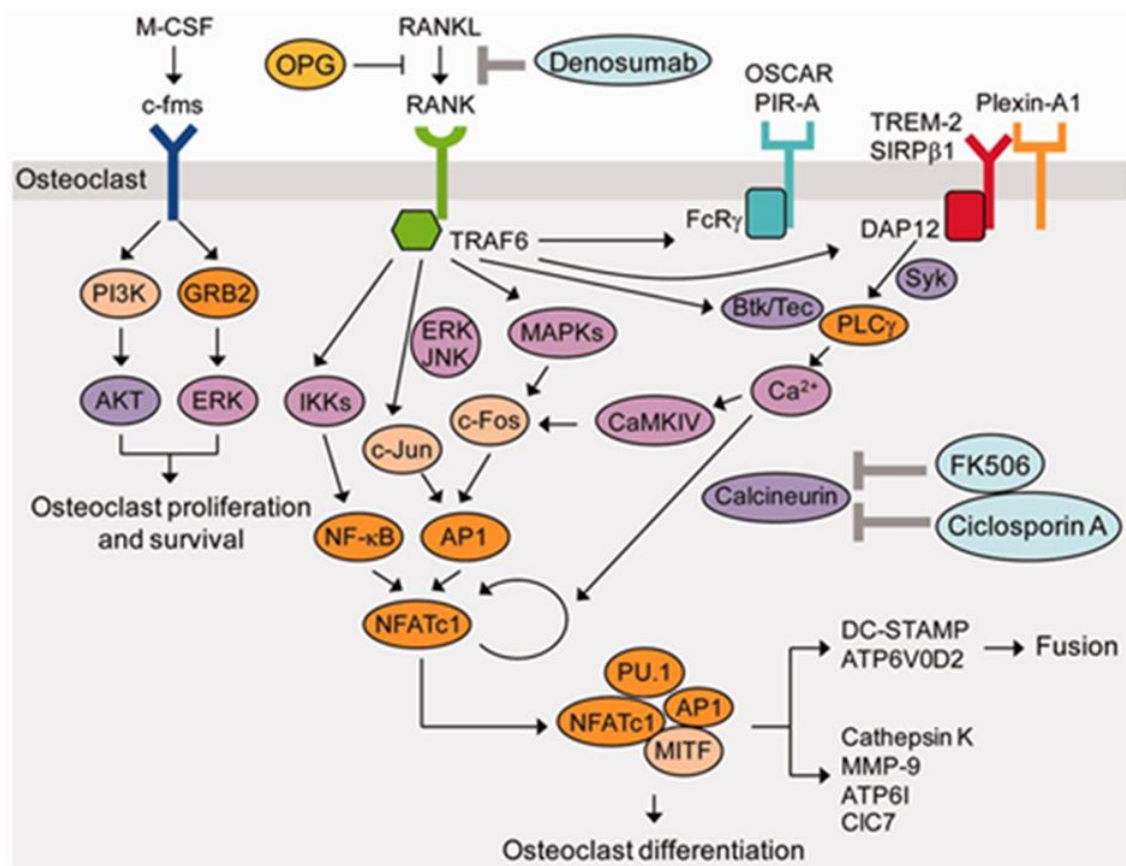


Figura 3.6. Señales y factores de transcripción implicados en la osteoclastogénesis, a partir del estímulo de RANKL (156)

Los niveles de ARNm de RANKL en los osteoblastos se ven promovidos en presencia de vitamina D, IL-1beta, IL-11, TNF-alfa, PTH elevada y PGE2 mientras que la presencia de otros factores, como TGF-beta, los reduce.

3.8 OSTEOPROTEGERINA (OPG)

El gen que codifica para esta proteína en humanos se encuentra en la región q24 del cromosoma 8. La proteína OPG se sintetiza inicialmente como un péptido de 401 aminoácidos, con un pro-péptido de 21 aminoácidos que es eliminado, resultando finalmente en una proteína madura de 380 aminoácidos. El extremo N-terminal tiene cuatro dominios ricos en cisteína y se relaciona con el receptor 2 de TNF y CD40. La región C-terminal contiene dos dominios homólogos de muerte, así como una región con un lugar de unión a heparina y un residuo de cisteína necesario para la homodimerización (136). Es miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF11B) que, a diferencia de todos sus parientes, no permanece tras su síntesis como una proteína transmembrana sino que es secretada. El ARNm de la OPG se expresa en numerosos tejidos humanos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroides y médula espinal) además de en el hueso (152,153).

Su principal función en el tejido óseo parece ser la inhibición de la maduración y activación de los osteoclastos, tanto in vivo como in vitro. Esto queda claramente de manifiesto en los experimentos realizados con ratones OPG knock-out (154,155), los cuales, aún siendo de apariencia normal al nacer, tienen una mayor tasa de mortalidad en la adolescencia debida a un incremento de la incidencia de fracturas vertebrales y femorales. El tejido óseo de estos animales se caracteriza por un alto grado de remodelado: huesos con pérdida trabecular y porosidad cortical aumentada. Además, estos ratones mostraban calcificaciones de la aorta y de las arterias renales ya desde las dos semanas de vida (154), extendiéndose ampliamente ya a los 2 meses.

La expresión de OPG es regulada por numerosas moléculas. Algunas de ellas favorecen su síntesis, como estrógenos, IL-1alfa, IL-1beta, TNF-alfa, TNF-beta, BMP-2, GH y TGF-beta mientras que otras la reprimen, como los glucocorticoides, PTH elevada y PGE2.

4. DIABETES Y MASA ÓSEA

La mayor fragilidad del esqueleto, en general, está condicionada por dos posibles variables dependientes del tejido óseo: una disminución de la densidad mineral ósea (DMO) o masa ósea, y/o una alteración de su calidad, de su estructura microscópica, determinada por sus componentes estructurales y la manera en que éstos se organizan. Además, en el mayor riesgo de la aparición de fracturas, un tercer elemento extraóseo ha de tenerse en cuenta: la propensión a las caídas. Estos tres factores fundamentales pueden verse afectados en los pacientes con enfermedad diabética y así hay estudios que lo demuestran, como comentamos a continuación.

4.1 Diabetes mellitus tipo 1 y masa ósea

Existen numerosos estudios que demuestran disminución de masa ósea en la diabetes tipo 1, tanto en niños como en adultos, desde los realizados con tecnología más antiguas como absorciometría de haz único, como con técnicas más actuales como densitometría de doble haz. La mayoría de los estudios recientes han confirmado que existe una disminución de masa ósea (DMO) en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. La DMO disminuye tanto a nivel de columna lumbar como de cadera (157,158,159,160,161)

Esta baja masa ósea se ha atribuido a una disminución de la formación ósea durante el crecimiento, y en adultos también se ha señalado un baja DMO en cuello de fémur, con niveles normales o ligeramente inferiores en columna lumbar, respecto a individuos sin DM (162,163,164,165). La baja

masa ósea se ha visto asociada a la presencia de complicaciones vasculares, tales como retinopatía y neuropatía (162,163), más que a la duración de la enfermedad o el mal control metabólico.

Aproximadamente el 60% de los pacientes tienen osteopenia y el 15-20% sufren osteoporosis.

Vestergaard en el 2007 (166) (Figura 4.1) publica un amplio metaanálisis de una base de datos recogida desde 1951 a 2005, con estudios de registro de base poblacional, estudios de casos y controles y cohortes. Revisa un total de 1499 artículos sobre diabetes y fracturas y 889 sobre diabetes y masa ósea. Una vez visto los que se ajustaban bien a los objetivos señalados, selecciona 65 trabajos para el estudio de masa ósea y 16 publicaciones para el objetivo de diabetes y fractura. En total el metaanálisis comprende a más de 30000 pacientes diabéticos. En relación a la masa ósea encuentra que, los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 presentan disminución de la densidad mineral ósea tanto a nivel de columna lumbar como de cadera, presentando un z-score de -0.22 ± 0.01 en columna y -0.37 ± 0.16 en cadera, ambas disminuciones con significación estadística ($p < 0.05$).

DIABETES Y HUESO (Meta-análisis)

Objetivos: MASA ÓSEA Y FRACTURAS. Bases de datos (1951-2005)

-Tipos de estudios: Epidemiológicos, con datos de registros de base poblacional, de casos-controles y cohortes.

-“DIABETES” y “FRACTURAS”. 1.499 artículos, se seleccionan 16.

-“DIABETES” y “MASA ÓSEA”. 889 artículos, se seleccionan 65.

Más de 30.000 D.M.

Figura 4.1. Diabetes Mellitus, masa ósea y fracturas.(166)

DIABETES Y HUESO (Meta-análisis)

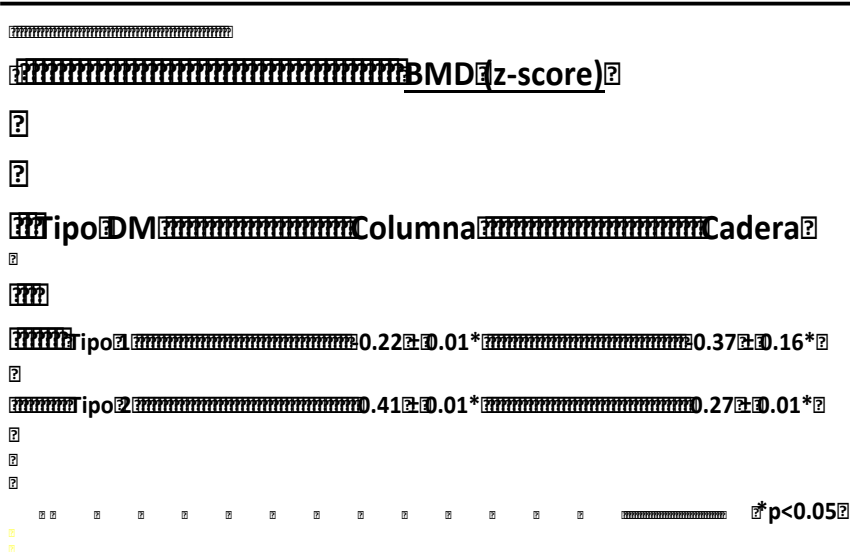


Figura 4.2. Diabetes Mellitus y BMD. (166)

Otros trabajos demuestran trabajos similares. MA Vazquez y cols (167), en un amplio grupo de pacientes con DM tipo1 de edad infantil encuentran que los niños diabéticos se diferencian progresivamente de los controles, hasta llegar a la adolescencia, cuando la disminución de masa ósea (DMO) de los pacientes diabéticos resulta estadísticamente significativo (167) (Figura 4.3).

DIABETES TIPO 1 (NIÑOS)

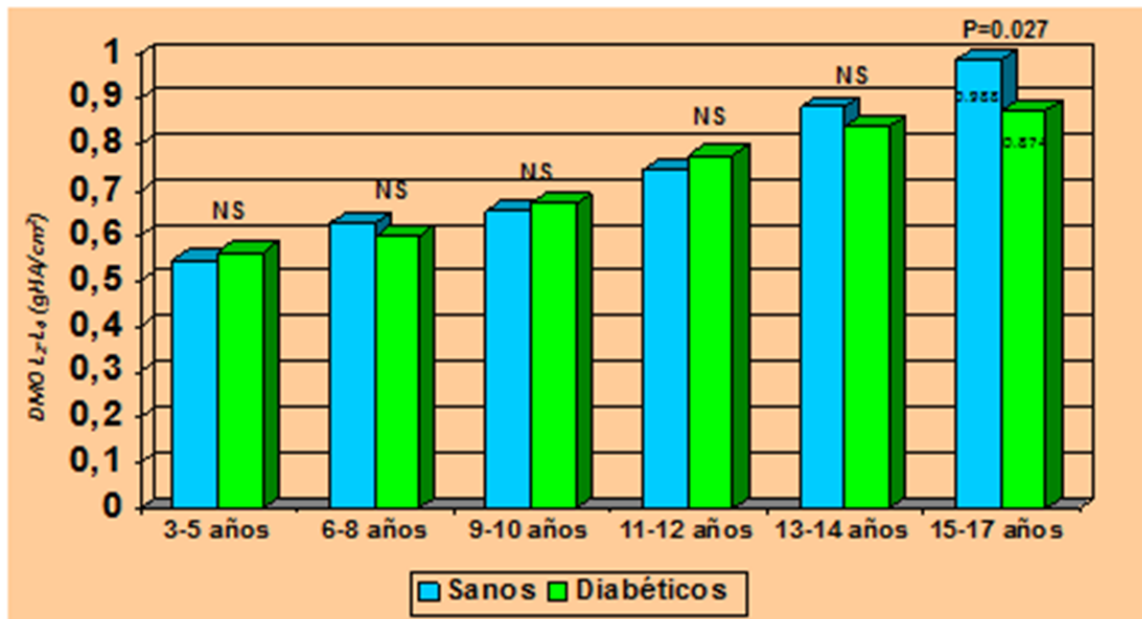


Figura 4.3. Evolución de masa ósea en pacientes de edad infantil con DM1. (167).

4.2 Diabetes Mellitus tipo 2 y masa ósea

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 no presentan, sin embargo, una disminución de masa ósea. La medida de DMO a nivel de columna lumbar y cadera demuestra en algunos casos una masa ósea normal y en la mayoría de las publicaciones existentes un aumento de masa ósea en relación a controles de la misma edad (168-178).

En España los datos son limitados, describiéndose un incremento del 8% en calcáneo, medido por ultrasonido, de mujeres con DM2 (179) mientras que en otro estudio realizado por el grupo GIUMO, en mujeres obesas de más de 65 años, se comprobó un incremento de DMO en columna lumbar, sin diferencias a nivel femoral ni de calcáneo, con respecto a la población no diabética (180).

En el metaanálisis de Vestergaard, previamente mencionado (166) (figura 4.2), se objetiva que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen un

aumento de 0.41 ± 0.01 desviaciones estándares (DS) en columna lumbar y 0.27 ± 0.01 en cadera, siendo ambos aumentos de masa ósea estadísticamente significativo en comparación a los controles no diabéticos de la misma edad ($p < 0.01$).

De los resultados de los estudios comentados se desprende, además, que los principales determinantes de los valores de DMO en la DM2 son la edad y el índice de masa corporal (IMC), señalando algunos autores, además, una relación negativa entre el control metabólico de la enfermedad (171) y los años de evolución de la misma con los niveles de masa ósea (169,170).

En la DM2, por tanto, no parece que la masa ósea sea el factor más importante que incremente el riesgo de fractura, proponiéndose el deterioro de la calidad ósea como el factor más importante, junto con el daño que el sistema neuromuscular pueda ejercer sobre el esqueleto, y la mayor propensión a las caídas en estos pacientes. Esta propensión a las caídas se relaciona fundamentalmente con las fracturas de cadera (181,182), y está favorecida por la existencia de los siguientes hechos: la retinopatía diabética que provoca pérdida de visión y la polineuropatía, la sarcopenia y los menores niveles de vitamina D, que conllevan mayor debilidad muscular; además, la nicturia, los episodios de arritmia asociados al fallo cardiaco y los episodios de hipoglucemia, tan comunes en estos pacientes, (183, 184,185,186,187,188,189).

Respecto a la alteración de la calidad ósea, se sugieren como responsables los múltiples desórdenes metabólicos propios de la enfermedad diabética y sus consecuencias (Figura 4.4) que analizaremos en apartados posteriores.

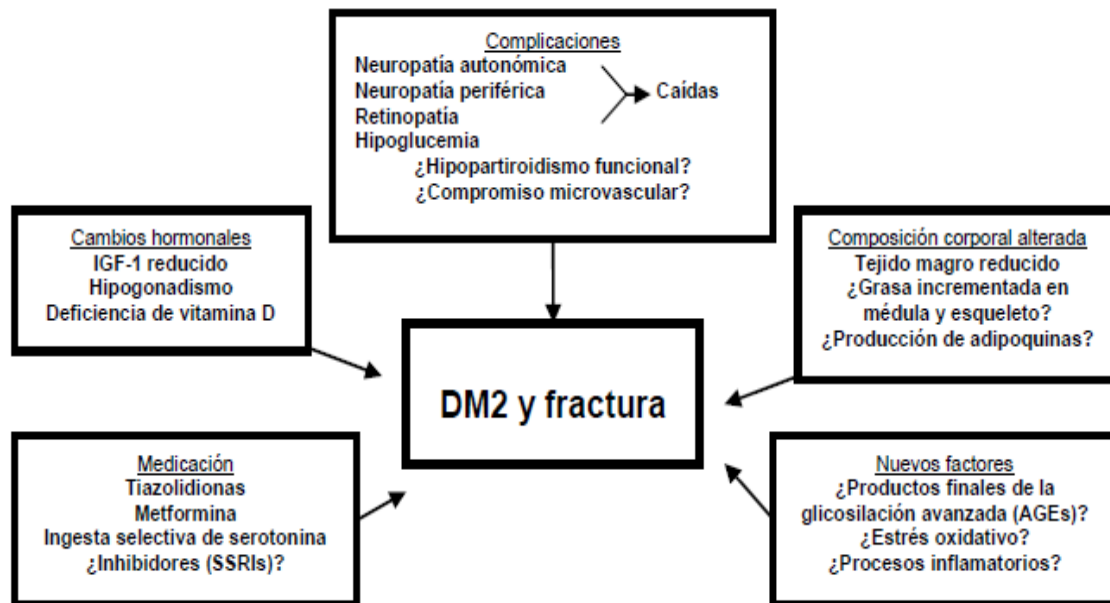


Figura 4. Mecanismos de fragilidad ósea en la diabetes mellitus tipo 2. Adaptado de (190)

El “trabecular bone score” (TBS), es un parámetro reciente que evalúa las variaciones en escalas de grises de cada punto en la imagen de la densitometría ósea y que parece estar relacionado con la microarquitectura ósea y el riesgo de fractura, independientemente del DMO (191-194). Conceptualmente, una trama trabecular densa, asociada a mayor resistencia mecánica, produce una imagen con muchos puntos de grises con pequeña variación entre ellos, dando un nivel elevado de TBS (asociado a una mejor estructura ósea); en contraposición, un valor de TBS bajo indica que se está produciendo variaciones importantes en los distintos puntos proyectados, lo que se asocia a una peor estructura ósea.

Existen distintos trabajos en los que el TBS es capaz de discriminar entre personas con o sin fractura y predecir el riesgo futuro de las mismas (195-198).

W.D. Leslie y cols (199) han estudiado el TBS en imágenes de densitometría de 2356 pacientes diagnosticados de diabetes mellitus tipo 2, encontrando que, los pacientes diabéticos tenían una DMO elevada en todas las regiones estudiadas pero el TBS en columna lumbar estaba disminuido ($p < 0.01$). El TBS lumbar fue un predictor de riesgo de fractura, independientemente de la DMO, en pacientes con diabetes mellitus, concluyendo que el TBS de columna lumbar predice el riesgo de fracturas osteoporóticas en pacientes con diabetes y mejora esta predicción en

relación a la DMO. Parece, por tanto, que el TBS se asocia mejor que la DMO con la calidad del hueso.

Lo que resulta claro es que tanto los pacientes con DM1, que tienen disminución de la masa ósea, como los diabéticos tipo 2, sin disminución e incluso con aumento de la misma, tienen un elevado riesgo de fractura, dejando ver que además de la cantidad de hueso, la disminución de la calidad del mismo juega un papel importante en el riesgo de fractura de los pacientes diabéticos.

5. DIABETES MELLITUS Y FRACTURAS

5.1 Diabetes Mellitus tipo 1 y fracturas

Los pacientes con DM1 presentan un riesgo aumentado de fractura en la mayor parte del esqueleto. Kelsey y cols, en un estudio de cohorte prospectivo que incluía a 9704 mujeres, de edad superior a 65 años, las pacientes diabéticas en tratamiento insulínico tenían un riesgo de fractura de húmero proximal casi cuatro veces superior a las no diabéticas (RR 3.79, IC 95% 1.16-12.36) (200).

Es cierto que este trabajo puede tener un sesgo ya que no todas las pacientes en tratamiento insulínico tienen que padecer necesariamente una diabetes tipo 1. Por ello, la asociación concreta entre fractura humeral y diabetes tipo 1 no queda totalmente aclarada. En relación a las fracturas de cadera los resultados son contundentes, ya que los estudios publicados demuestran que el riesgo se multiplica de 6 a 12.5 veces en relación a la población no diabética. Por ejemplo Forsen y cols, (201) encuentran un incremento del riesgo de fractura de cadera en mujeres con DM1 entre 50 y 74 años (RR 6.9, IC 95% ; 2.2-21.6). Otros diferentes estudios publicados encuentran hallazgos similares, por lo que no los describimos individualmente. Solo mencionaremos el estudio de Janghorbani y cols (202). Ellos encuentran que las mujeres con DM1 multiplican por 7 el riesgo de sufrir una fractura de cadera comparada con mujeres controles (RR 6.3; IC 95%: 2.6-15.1).

La mayoría de los trabajos publicados que hacen referencia a riesgo de fractura de cadera en DM1, están incluidos en el metaanálisis de Vestergaard previamente referido. En este metaanálisis se objetiva un riesgo relativo de 6.94 (IC 95%; 3.25-14.78) cuando incluyen el total de las publicaciones y de 8.65 (IC 95%; 7.26-10.30) cuando eliminan del total aquellas publicaciones que no superan el test de heterogeneidad (Figura 5.1)

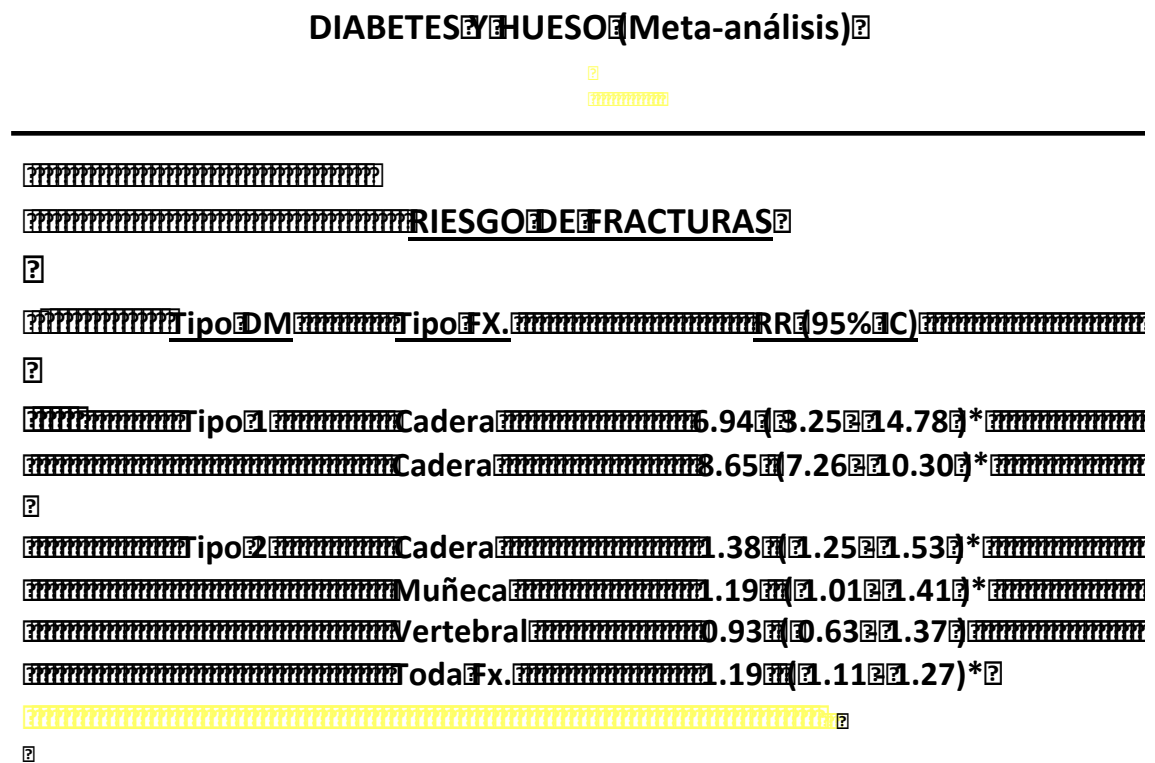


Figura 5.1. Riesgo de fracturas de distintas localizaciones en DM 1 y DM 2 (166)

Los datos de este metaanálisis demuestran que teniendo en cuenta la masa ósea como predictor de riesgo de fractura, los pacientes con DM1 multiplican, al menos, por 5 el riesgo de padecer una fractura de cadera en relación al que se esperaría teniendo en cuenta la masa ósea de estos pacientes (Figura 5.2).

Vestergaard y cols (166) indagaron también la asociación de DM1 con otros tipo de fracturas y encontraron un RR de 1.3 (IC 95% 1.2-1.5) para padecer cualquier fractura y RR 2.5 (IC 95% 1.3-1.6) para fracturas vertebrales.

???

DIABETES Y HUESO (Meta-análisis)

RR de Fr. encontrado y RR esperado según DMO

tipo DM	tipo Fr.	RR esp.	RR encontr.
tipo 1	Cadera	1.42	6.95-8.65 (x5)
tipo 2	Cadera	0.77	1.38 (x1.8)
Toda Fr.		0.85	1.19 (x1.4)

No existe relación entre DMO y HbA1C. Mayor riesgo de fractura y menor DMO en los pacientes con complicaciones de la diabetes.

Figura 5.2. Riesgo relativo de fractura de cadera en DM 1 y DM 2. (166).

Muy recientemente se ha publicado un estudio basado en un registro nacional de Escocia, donde se valora el riesgo de fractura de cadera tanto en DM1 como en DM2 (203).

Usando la base de datos del registro nacional de Escocia de Diabetes Mellitus, identifican a todos los pacientes con DM 1 y DM 2 de edad comprendida entre 20 y 84 años, que estaban vivos desde el 1 Enero de 2005 hasta 31 Diciembre de 2007, y estudian la incidencia de fractura de cadera. En relación a DM tipo 1 recogen a 21.033 pacientes (supone 59.585 personas/año). En ellos se detectaron un total de 105 fracturas de cadera mientras que en la población no diabética (10.980.599 pesonas/año) ocurrieron 11.733 fracturas de cadera. El riesgo de fractura de cadera en la diabetes tipo 1 estaba claramente incrementado en relación a la población general, RR 3.28 (IC 95% 2.52-4.26) en hombres y RR 3.54 (IC 95%: 2.75-4.57) en mujeres. El riesgo relativo resultó ser más alto en personas

más jóvenes, sugiriendo la fragilidad precoz del hueso diabético (204) (Figura 5.3).

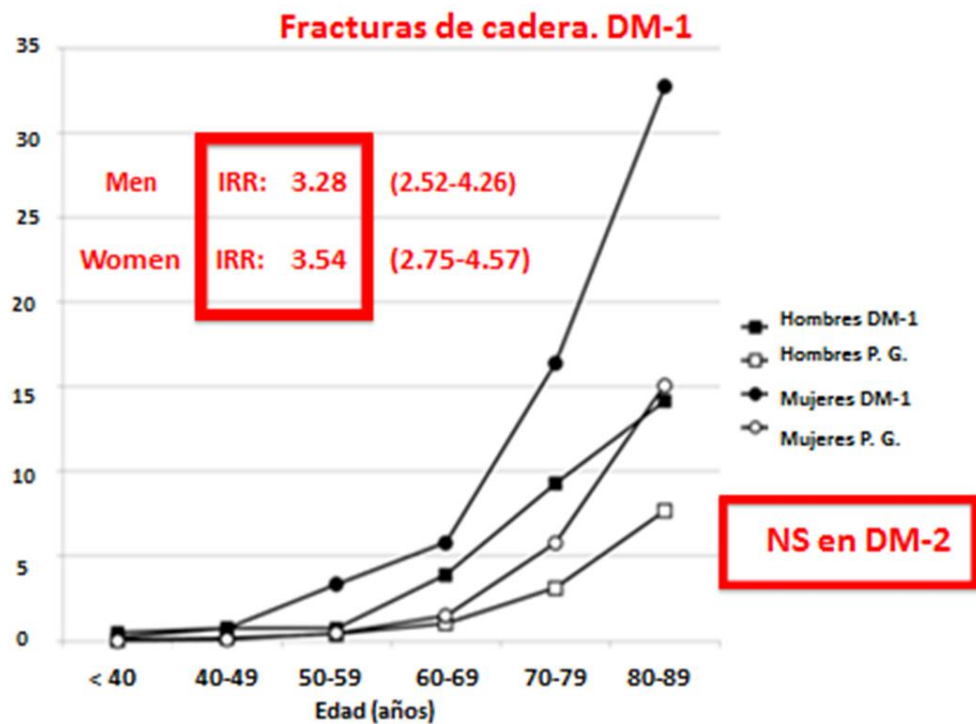


Figura 5.3. Incidencia de fractura de cadera (RR) en DM 1 y DM 2.(204)

Janghorbani M y cols (205), en un amplio metanálisis en el que se incluyen distintos estudios de cohortes y casos-controles, encuentran también un aumento importante de riesgo de padecer fractura de cadera en los pacientes con DM 1(RR 6.3, IC95% 2.6-15.1) (Figura 5.4).

Diabetes mellitus tipo 1 y riesgo de fractura de cadera (estudios de casos-controles y cohortes)

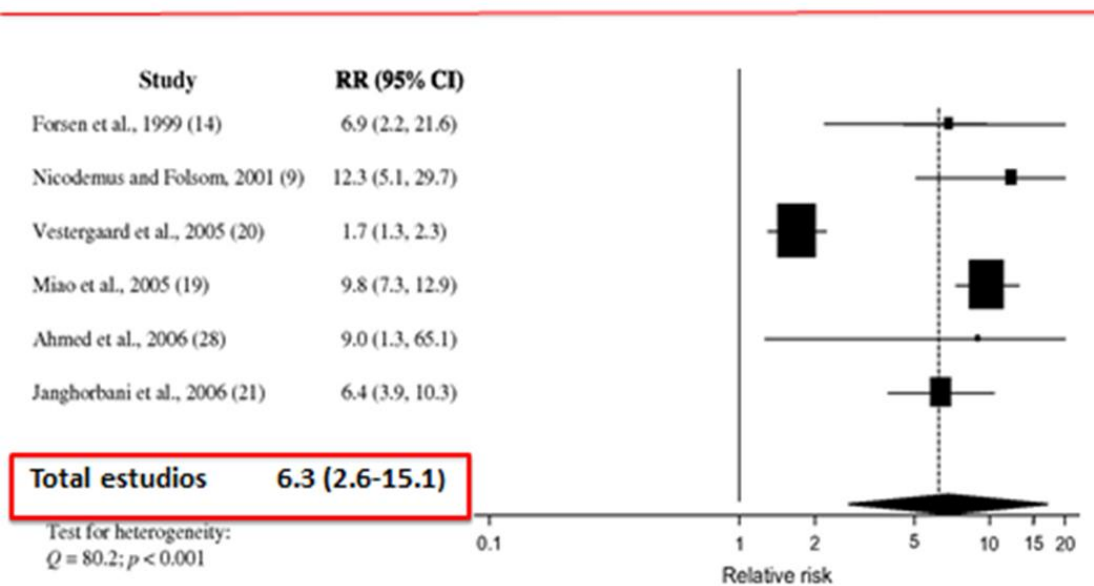


Figura 5.4. Riesgo Relativo de fractura de cadera en DM 1. Estudios de casos-controles y cohortes. (205)

5.2 Diabetes Mellitus tipo 2 y fracturas

También en la diabetes mellitus tipo 2 se ha encontrado un aumento de riesgo de fractura, aunque de menor magnitud que en la DM 1. Concretamente, el riesgo relativo de sufrir una fractura de cadera incrementa entre 1.5 y 2.8 veces en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Forsen y cols (201) encuentran un aumento del riesgo de fractura de cadera (RR 1.8; IC 95% 1.1-2.9), aunque este incremento no alcanza significación estadística después de ajustarlo por complicaciones de la diabetes como visión disminuida y alteraciones motoras (RR ajustado 1.5; IC 95%: 0.9-2.5).

Nicodemus y cols (206) encuentran un RR de 1.7; IC 95%: 1.2-2.4 de fractura de cadera en DM 2. Además encuentran que la mayor duración de la diabetes y el uso de medicación específica (insulina o antidiabéticos orales) se asocia a mayor riesgo de fractura (207). Otros diferentes trabajos recogidos en una revisión muy reciente de Schwartz AV (208) muestran resultados similares, por lo que no los detallamos de forma individual.

En el metanálisis de Vestergaard, el aumento del riesgo de fractura de cadera es de un 38% (25%-53%), en consonancia con los anteriormente referidos (Figura 5.1).

En el metaanálisis de Janghorbani y cols, se objetiva un aumento claro del riesgo de fractura de cadera en DM tipo 2 (RR 1.7; IC 95%: 1.3-2.2) (Figura 5.2)

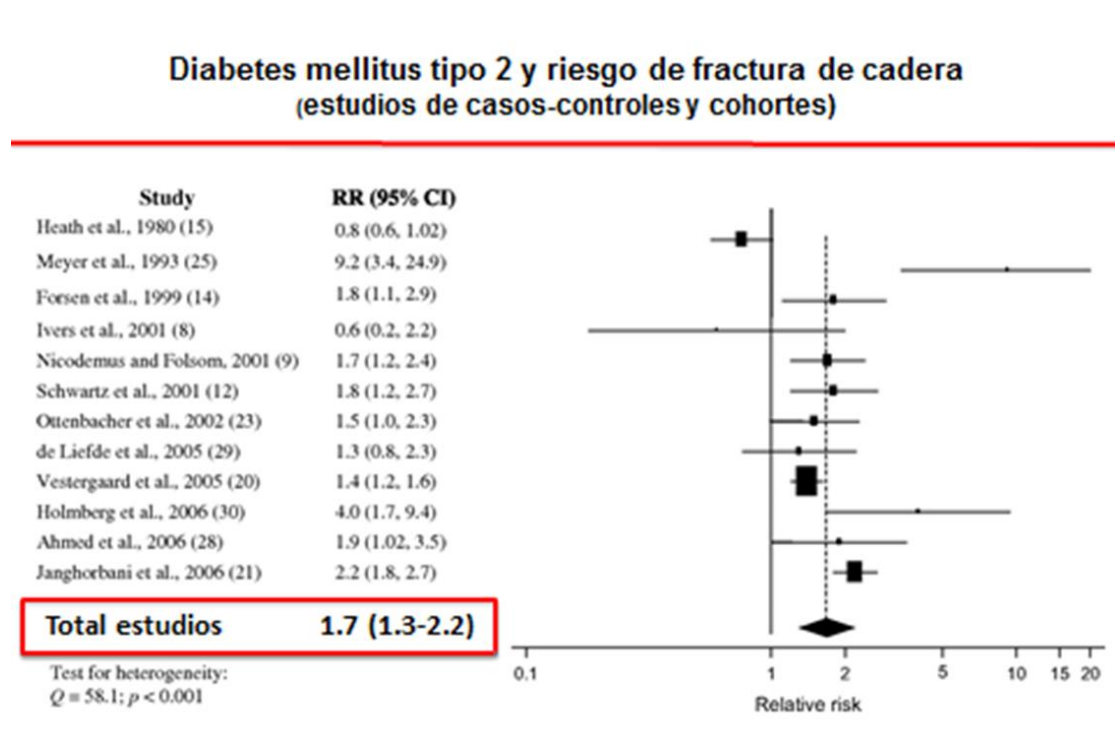


Figura 5.5. Metanálisis de estudios de cohortes y casos-controles de riesgo relativo de fractura de cadera en pacientes con DM 2. (205)

En la publicación ya referida de Hothershall EJ y cols (204) no se encuentra aumento de riesgo (Figura 5.3).

También se ha estudiado el riesgo de fractura vertebral en los pacientes con DM 2, y mientras algunos autores (166) no objetivan aumento de riesgo, en otros trabajos se encuentra un aumento estadísticamente significativo, variando desde un RR cercano a 2 en las mujeres hasta un RR mayor de 4 en varones (209) (Figura 5.6).

DM-2 y riesgo de fractura vertebral

Presencia de Fractura vertebral (Rx. lateral columna)

Variables Independientes	O.R.	95% (IC)	p
Mujeres			
DM-2 Sí/No	1.86	(1.11 – 3.12)	0.019
Hombres			
DM-2 Sí/No	4.73	(2.19 – 10.20)	< 0.001

La presencia de DM-2 se ajustó por la edad, IMC y L-BMD

La BMD se asoció con la presencia de Fractura vertebral en los controles, pero no en los pacientes con DM-2.

Figura 5.6. Riesgo relativo de fractura vertebral en hombres y mujeres con DM 2 (209)

En el estudio de la disminución de resistencia ósea que lleva a los pacientes diabéticos al aumento de riesgo de fractura, merece destacar una publicación muy reciente (210), que encuentra una disminución de los parámetros de microarquitectura trabecular en la DM 1. En mujeres postmenopáusicas con DM tipo 2, se ha encontrado un aumento llamativo de la porosidad cortical (211) (Figura 5.7). También se ha encontrado con técnica de microindentación una disminución de la resistencia ósea (“bone material strength”- BMS) en este tipo de pacientes (212).

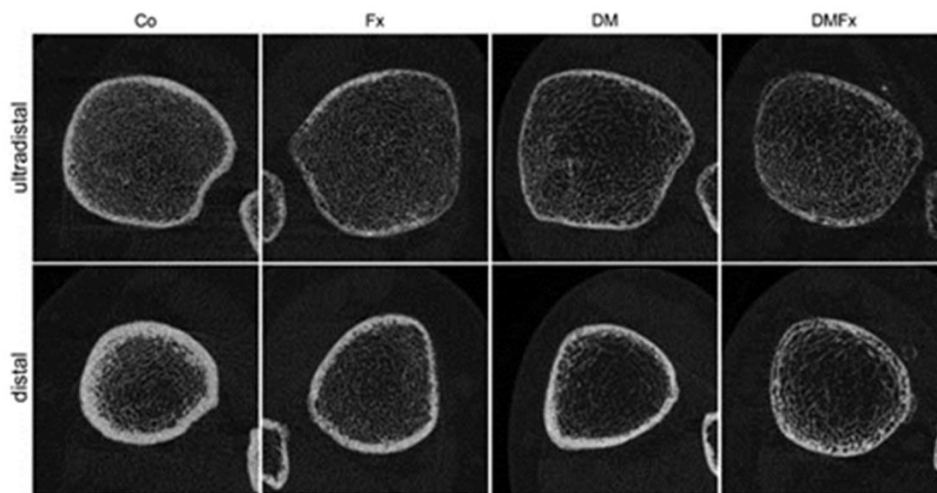


Figura 5.7. Aumento de la porosidad cortical en pacientes con DM tipo 2. (Co:controles, Fx: controles con fractura, DM:diabetes mellitus tipo 2, DMFx: DM 2 con fractura.

6. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS QUE PUEDEN ESTAR IMPLICADOS EN LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO DE LA DIABETES MELLITUS

A pesar de la bien conocida relación entre enfermedad diabética y osteoporosis, derivada de estudios clínicos y epidemiológicos, como acabamos de comentar, y ser muchos los factores propuestos como responsables, son muy escasos los estudios que analicen la importancia de cada uno de ellos, así como el mecanismo de acción íntimo, que les lleve al deterioro del metabolismo óseo.

En este sentido, entre los factores propuestos, como se resume en la Figura 6.1, se encuentran: la hiperglucemia a la que se ve sometido el hueso y el

microambiente de la médula ósea; el déficit o resistencia a la insulina y la alteración de insulin-like growth factor-I (IGF-I); el incremento de los niveles de productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs) y su efecto sobre las proteínas de la matriz ósea (especialmente los “cross-links” de las moléculas de colágeno); las alteraciones del estrés oxidativo y la subsiguiente producción de especies oxígeno-reactivas (ROS); la producción de moléculas inflamatorias (como de adipoquinas y citoquinas) y su efecto negativo sobre las células óseas (213-220), cambios en la homeostasis del calcio y el efecto de algunos fármacos empleados para el control metabólico de los enfermos diabéticos (221).

Todos estos factores podrían actuar sobre las células específicas del tejido óseo, sobre su diferenciación, función y/o apoptosis, así como sobre el microambiente celular, la matriz ósea y su mineralización, todo lo cual podría llevar a la menor resistencia ósea que se observa en estos pacientes. El conocimiento actual que tenemos sobre ello es aún escaso y en su gran mayoría procede de estudios celulares y en animales de experimentación, sin suficiente validación en humanos.

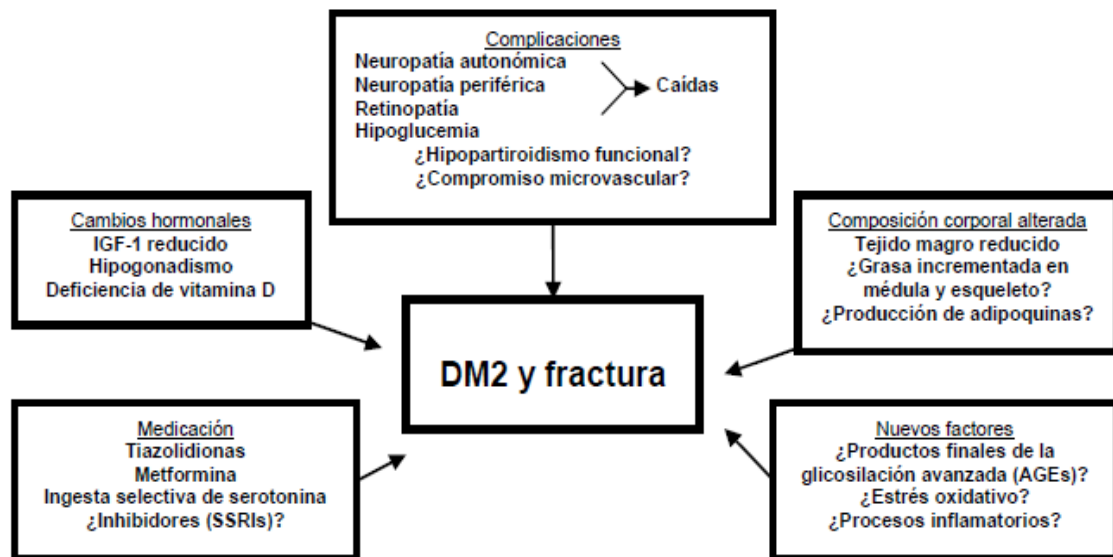


Figura 6.1. DM tipo 2 y fractura. Mecanismos fisiopatológicos.

6.1 Alteraciones en la biología celular ósea

Diversos estudios llevados a cabo “in vitro” reflejan los efectos negativos de la enfermedad diabética sobre los procesos de formación ósea, mostrando menor proliferación celular y grado de mineralización, junto a un mayor grado de apoptosis (222-231). Este efecto se ha visto en modelos de ratones con DM1 y en ratas con DM2. En los primeros se ha comprobado niveles disminuidos de expresión génica de marcadores de formación, como son Runx2, colágeno tipo 1 (COL 1), fosfatasa alcalina y osteocalcina (234), y un deterioro en los índices histomorfométricos, como el número y grosor de las trabéculas (235), efectos todos que fueron revertidos con la terapia insulínica. Respecto a la DM2, en ratas diabéticas y obesas (modelo de rata Zucker Diabetic Fatty o ZDF) que fueron sometidas a osteotomía y fijación externa, se comprobó una disminución en la formación ósea, tanto en la zona del endostio como del periostio, con una disminución en la cantidad y densidad de las fibras de colágeno, lo que podría reflejar un número reducido de células fibroblásticas y/o un descenso de la formación de la matriz ósea; se objetivó también un aumento en el número de adipocitos en la médula ósea adyacente, en comparación con las ratas control. Estos datos se relacionaban con la deficiencia en la señalización de la leptina, con la resistencia a insulina y con la hiperglucemia (236).

En otro estudio realizado en ratas diabéticas no obesas (modelo de rata Torii) se observó, de manera indirecta, por medio de parámetros hitomorfométricos, una disminución significativa del número y la función de los osteoblastos y osteoclastos con respecto a los controles. El estrés oxidativo era significativamente mayor en estas ratas y las propiedades biomecánicas estaban afectadas. Se observó, además, que los efectos de la reducción en la formación ósea, de nuevo, eran revertidos con terapia insulínica (237).

6.2 Papel de la insulina, otras hormonas osteotrópicas derivadas del páncreas y hormonas derivadas del tejido graso sobre el metabolismo óseo.

Entre la DM1 y la DM2, existen típicamente diferencias en el peso corporal que pueden influir en los resultados de DMO que se describe en cada una de ellas. Junto a las diferencias en el IMC, también las encontramos en el perfil hormonal. Mientras que en la DM1 hay un déficit absoluto de insulina y los niveles séricos de IGF-1 y hormonas esteroideas son bajos,

en la DM2 suele existir resistencia a la acción de la insulina, con hiperinsulinemia, exceso de estrógenos y andrógenos y niveles normales de IGF-I (238-240). La disminución de masa ósea descrita en pacientes con DM1, a diferencia de valores más altos en la DM2, se ha relacionado, al menos en parte, con el déficit de insulina. El daño de las células beta pancreáticas, lleva a una menor secreción de insulina junto a otros péptidos tales como la amilina (IAPP) y la preptina, ambos miembros de la familia de péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (241-243). El descenso en la producción de estos péptidos lleva a una reducción de la proliferación, diferenciación y resistencia a la apoptosis de los osteoblastos, a través de su efecto sobre el gen RUNX2. Por todo ello se ha sugerido que la falta de insulina y su potente efecto anabólico sobre los osteoblastos, podría ser responsable de la baja masa ósea de pacientes con DM1, la cual mejora a largo plazo con el tratamiento insulínico (244-245).

En los pacientes con DM2 es típica la resistencia a la insulina y está relacionada con el incremento y la distribución centrípeta del tejido adiposo, lo cual puede asociarse a alteraciones en el metabolismo óseo que favorecen el desarrollo de osteoporosis. Por una parte, el tejido adiposo visceral es un predictor negativo de DMO de columna y cuerpo completo en jóvenes obesas (246). Por otra parte, el exceso de grasa subcutánea en estos pacientes, con menor tejido magro, puede modificar el impacto mecánico sobre el hueso, alterar el equilibrio y favorecer las caídas y, con ello, las fracturas (247-248).

Otro aspecto negativo del tejido adiposo sobre el esqueleto es el hecho de que los adipocitos son origen de adipocinas y citoquinas inflamatorias, que pueden alterar el remodelado óseo tanto a través de la estimulación de la resorción como suprimiendo la formación ósea (249-250),

En la médula ósea, las células progenitoras de osteoblastos y adipocitos proceden del mismo precursor mesenquimal, que deriva hacia un linaje celular u otro dependiendo de la actuación de los factores de transcripción Runx2 o PPARgamma, respectivamente, y la diferenciación hacia una vía ocurre a expensas de la otra (250-251), por lo que una mayor diferenciación de las células madres mesenquimales hacia la vía celular de estirpe adipocítica, conlleva una disminución preceptiva de formación de células de estirpe osteoblástica.

Si bien es cierto que no está clara la relación causal entre los cambios morfogénicos de la médula ósea con el desarrollo de osteoporosis, existen evidencias que apuntan en este sentido. En efecto, con el envejecimiento, cuando existe la mayor prevalencia de osteoporosis, se produce una

desviación importante de las células madres mesenquimales hacia la línea adipocitaria (la médula ósea aparece llena de grasa) con disminución importante de células osteoblásticas (la DM, por sus múltiples alteraciones, evoluciona como un envejecimiento precoz). Además, en muchas de las formas secundarias de osteoporosis, la pérdida de hueso trabecular se acompaña de una infiltración medular progresiva de células grasas. No obstante, la función fisiológica de estas células grasas de la médula ósea es compleja y aún poco definida.

En animales de experimentación con DM1 se comprueba un cambio progresivo hacia médula grasa mientras que en individuos con resistencia a la insulina y/o únicamente obesidad, no se comprueba este hecho (252). En la Figura 1.3 se resumen los potenciales mecanismos responsables de la osteoporosis y la fractura osteoporótica en ambos tipos de diabetes.

La leptina y la adiponectina son dos adipoquinas íntimamente ligadas a la regulación sistémica del remodelado óseo, como se explicará más al detalle posteriormente.

En pacientes con DM1 los niveles de leptina sérica están disminuidos, pero su contribución a la pérdida de hueso o disminución de masa ósea es incierta. Por el contrario, en la DM2 no es diferente respecto a controles no diabéticos (253).

En el caso de la adiponectina, estudios clínicos realizados en pacientes con DM2 han comprobado que los niveles séricos de ésta se asocian con la DMO, recambio óseo y la presencia de fracturas vertebrales (254). Además, se ha comprobado que esta hormona se relaciona con los niveles de osteocalcina durante el control glucémico, lo cual parece una vía de relación entre metabolismo de la glucosa/graso y óseo (255).

Numerosos estudios en modelos animales demuestran que la señalización de la insulina en los osteoblastos regula la producción y biodisponibilidad de la osteocalcina, la cual, a su vez, actúa de manera endocrina para regular la secreción de insulina en el páncreas y la respuesta periférica a la insulina (256-259). En cambio, parece ser que la señalización de la insulina descende los niveles de expresión génica de osteoprotegerina (OPG) en el osteoblasto (Figura 6.2).

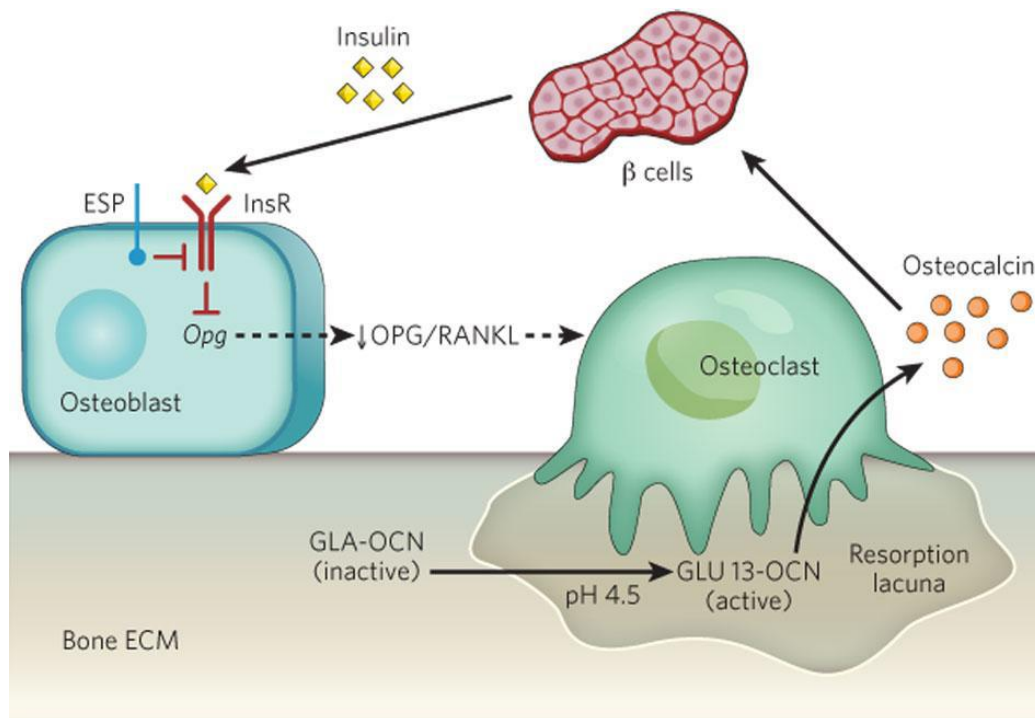


Figura 6.2. Regulación hacia delante que une a la insulina, la resorción ósea y la actividad de la osteocalcina (OCN). ECM: matriz extracelular; ESP: tirosina fosfatasa; Ins R: receptor de insulina (123).

El descenso del cociente osteoprotegerina/ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-beta (ratio OPG/RANKL) resulta en un incremento del número de osteoclastos con aumento de la expresión génica de una bomba de protones en estas células (*Tcirg1*), que acidifica la laguna de resorción por el aumento que produce en la concentración de H^+ , lo que facilita la degradación de la matriz y la liberación de la osteocalcina allí almacenada; finalmente, este medio ácido estimula la decarboxilación de la osteocalcina.

6.3 Acción pleiotrópica de la osteocalcina

El gen de la osteocalcina (OCN) presenta una única copia en el cromosoma 1, tiene 4 exones y 3 intrones y codifica para una proteína de 11kDa. Es sintetizada como pre-pro-OCN en los osteoblastos y, tras varias modificaciones postranscripcionales, se forma la proteína madura de 49 aminoácidos (constituida por los exones 3 y 4). Ésta es secretada al exterior de la célula, quedando la mayor parte en la matriz ósea mineralizada, mientras que el resto pasa a la circulación sanguínea, pudiendo ser detectada en el suero.

Recientemente se ha determinado que cuando la OCN está carboxilada (GLA-OCN) posee una gran afinidad por la hidroxiapatita, quedando unida a la MEC y en su forma descarboxilada (GLU13-OCN) pierde dicha afinidad, adquiriendo una función hormonal, alterando la expresión, secreción y sensibilidad de la insulina. Así, niveles altos de OCN descarboxilada producen un aumento de la insulina en el medio.

La descarboxilación de la OCN puede producirse fuera de la célula a $\text{PH} < 7$, como el que se produce en las lagunas de reabsorción ósea (94). Como se ha mencionado previamente, durante la reabsorción ósea, los osteoclastos liberan H^+ en las lagunas de Howship, lo que favorece un medio ácido que facilita la reabsorción ósea al tiempo que se activa y libera a la sangre OCN descarboxilada. La OCN se utiliza como marcador bioquímico específico de formación ósea. Los niveles en suero se correlacionan con el crecimiento del esqueleto y en la edad adulta, los niveles elevados de OCN nos indican un aumento del recambio óseo (260).

La OCN se reconoce como un nexo entre el metabolismo óseo y el de la insulina (123) (Figura 2.1).

Las células osteoblásticas presentan receptores para la insulina. Una vez que se efectúa la unión insulina-receptor, se produce una inhibición de la síntesis y secreción de OPG, con disminución de la relación OPG/RANKL y aumento de la actividad osteoclástica, que conlleva el aumento de la liberación de osteocalcina y su descarboxilación. Se ha comprobado que la osteocalcina descarboxilada estimula la proliferación de las células beta pancreáticas y la producción de insulina, al tiempo que aumenta la sensibilidad a la misma. También estimula la producción de adiponectina (261,262), lo que contribuye al mejor control del metabolismo hidrocarbonado. En el testículo, regula la producción de testosterona (263), lo cual influye a su vez en la formación y remodelado óseo.

6.4 Influencia de la hiperglucemia y AGEs sobre el metabolismo óseo.

6.4.1 Hiperglucemia

Los niveles elevados de glucosa se sabe que ejercen un efecto negativo sobre el metabolismo óseo, relacionado con varios aspectos: el envejecimiento acelerado de la médula ósea, debido al incremento de las especies reactivas de oxígeno (264,265); la toxicidad directa que ejercen sobre los osteoclastos (264); los cambios en las hormonas calciotropas,

tales como mayores niveles de hormona paratiroidea (PTH) en relación con el incremento de la hipercalciuria y/o la hipomagnesemia y los cambios en los niveles de factores de crecimiento circulante, como los descensos de IGF-I, descritos en DM1 (266).

Los efectos de la hiperglucemia sobre los osteoblastos han sido estudiados en modelos animales y líneas celulares, pero son muy escasos los estudios realizados sobre cultivos de osteoblastos humanos procedentes de biopsias óseas y mucho menos el número de ellos realizados en pacientes diabéticos. Los resultados no son del todo consistentes, pero sí se desprende que un ambiente hiperglucémico ejerce efectos negativos sobre los procesos de proliferación y diferenciación, biomineralización de la matriz y expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo óseo (sialoproteínas óseas, osteocalcina, citoquinas proinflamatorias, RANKL, Runx2, OPG, receptor de AGEs, ...etc) (267-269, 270-272).

La hiperglucemia tiene también efectos indirectos sobre el esqueleto, ya que favorece la hipercalciuria e interfiere con el sistema PTH/vitamina D. Con respecto a ésto, se ha observado que la sobrecarga oral de glucosa en mujeres posmenopáusicas no diabéticas suprime la secreción de PTH e induce hipercalciuria e hipocalcemia (273). Por el contrario, la mejoría del control glucémico en DM2 mal controlados reduce la excreción urinaria de calcio y fósforo (274).

En los pacientes con DM2 en los que, como venimos comentando, se propone una alterada calidad ósea como responsable de la menor resistencia ósea, más que a la disminución de la DMO, se han sugerido dos mecanismos como principales implicados. Uno, la hiperglucemia crónica, y otro el incremento de la fibras cruzadas del colágeno, al que dan lugar los niveles más altos de los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs), tales como la pentosidina, y su asociación con un incremento del riesgo de fracturas (275,276).

6.4.2 AGEs

Los AGEs se generan por la glicosilación esencial y no enzimática de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y se acumulan en distintos tejidos durante el envejecimiento fisiológico normal. Este proceso, sin embargo, se ve acelerado en presencia de patologías como la DM o las asociadas a procesos inflamatorios crónicos (277,278). Estos productos se forman

inicialmente al combinar grupos carbonilo de azúcares con los grupos aminos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos para formar bases de Schiff. Estas combinaciones son inestables y rápidamente se transforman en compuestos más estables llamados “productos finales de la glicosilación avanzada” (AGEs) (279) (Figura 6.3), que pueden actuar mediante dos mecanismos distintos: modificando moléculas intracelulares y extracelulares alterando sus funciones biológicas normales, o uniéndose al receptor (AGER) y provocando una respuesta intracelular.

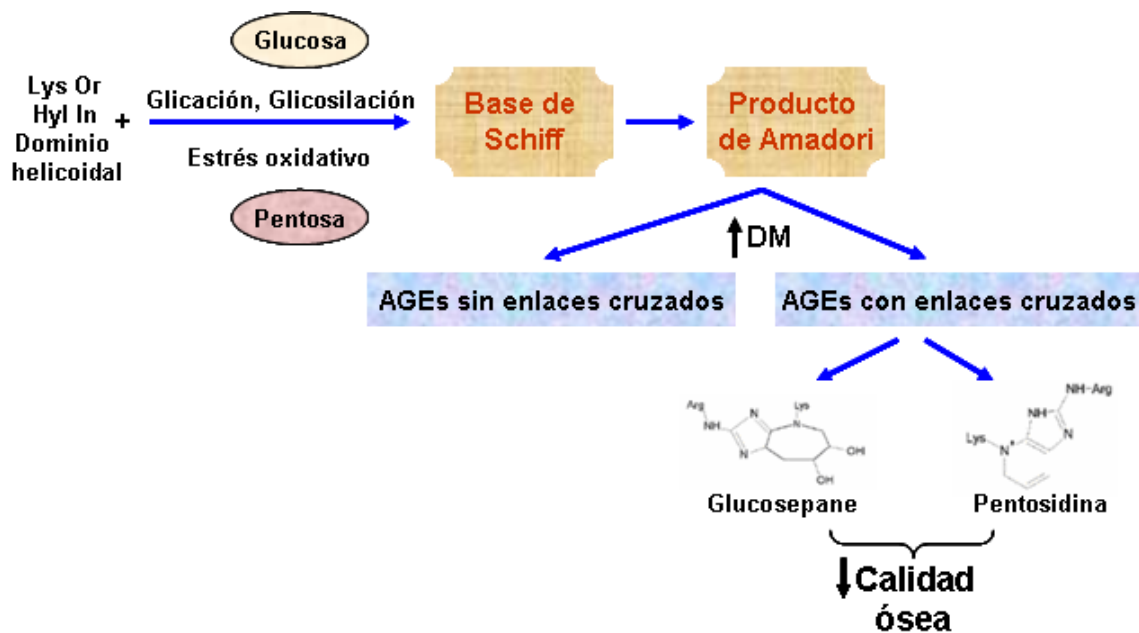


Figura 6.3. Formación de cross-link no enzimáticos en el colágeno óseo. El incremento de este fenómeno en la diabetes mellitus es un mecanismo por el cual emerge la fragilidad ósea (280).

Los niveles de AGEs también se pueden encontrar aumentados en el organismo debido a fuentes exógenas, que se dan en hábitos poco saludables tales como fumar o la ingesta de alimentos poco cocinados. Se ha comprobado que los AGEs exógenos permanecen activos tras la ingesta

oral y que los niveles son mayores en pacientes diabéticos frente a los que no padecen esta patología (281,282).

6.4.3 Receptor de AGEs (AGER)

El receptor de productos finales de la glicosilación avanzada (AGER) pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas de superficie celular y se une a productos finales de la glicosilación avanzada no enzimática (AGEs). En humanos, el gen AGER se localiza en el complejo mayor de histocompatibilidad clase III (MHCI) y cuenta con una extensión de 3,28kb en la región p6 del cromosoma 21.3. Contiene once exones y diez intrones, que dan lugar a un ARNm de aproximadamente 1.5 kb (283). Se expresa en una gran variedad de tipos celulares: macrófagos, monocitos, linfocitos T, células endoteliales, células musculares lisas, células neuronales, miocitos cardíacos y células óseas (284,285).

Su dominio extracelular, de 332 aminoácidos, consiste en un péptido señal unido a tres regiones de tipo inmunoglobulina: una región tipo “V” seguida de dos regiones tipo “C”. Además, AGER está formado por una única región transmembrana y una región corta citosólica de 43 aminoácidos (286). Los estudios realizados sobre su estructura y función revelan que el dominio V es crucial para la unión del receptor con sus ligando y que la cola citosólica es esencial para desencadenar la señalización intracelular (Figura 6.4).

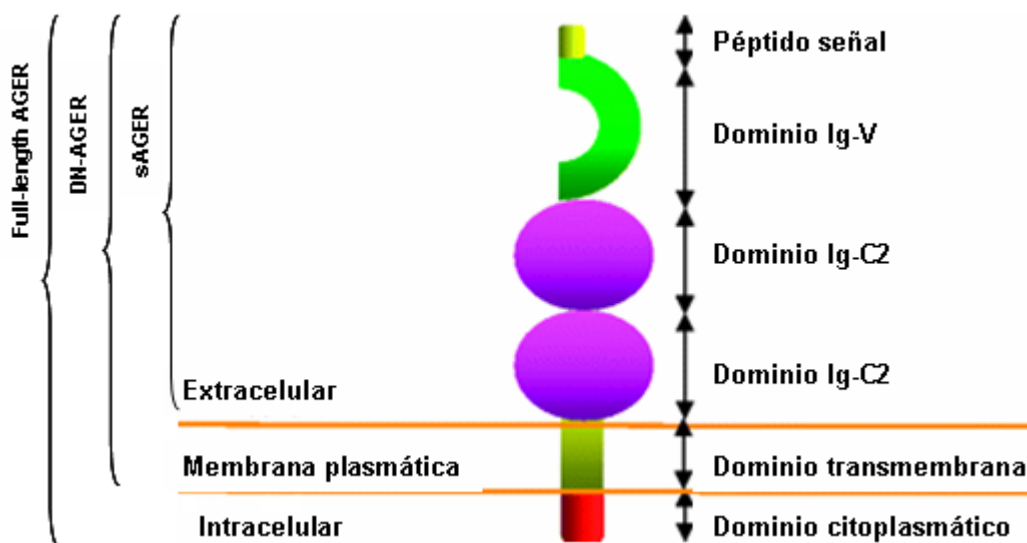


Figura 6.4. Representación esquemática de la interacción AGER-ligando. sAGER: AGER soluble (dominio extracelular de AGER); DN-AGER: AGER dominante

negativo (dominio extracelular + dominio transmembrana); Full-length AGER:AGER completo. Adaptado de (287)

Además de esta forma completa de AGER, existen dos isoformas truncadas: sAGER (AGER soluble), la cual es soluble al medio extracelular y carece de los dominios transmembrana y citosólico; y DN-AGER (AGER dominante negativo) que carece del dominio citosólico. Ambas formas impiden la señalización mediada por AGER, y DN-AGER, además, impide la señalización intracelular incluso en células que poseen la forma completa del receptor en su membrana (Full-length AGER). Ambas tienen un efecto protector contra los efectos deletéreos que provoca un incremento de interacciones AGER-AGEs, como ocurre cuando hay un aumento de AGEs, ya que, a pesar de unirse a su ligando, no transmiten la señal al interior de la célula (287,288).

El complejo AGEs-AGER produce, entre otros efectos, un aumento del estrés oxidativo, regula vías de señalización intracelular con influencia del crecimiento y proliferación celular (i.e. Erk ½, MAP kinasas, p38, Rho, GTPasas,...etc), modula la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria (IL-1, IL-6 y TNF-alfa) a través de la activación del factor nuclear k-beta, estimula la expresión de factores de crecimiento y moléculas de adhesión, aumenta la permeabilidad vascular, promueve la migración de macrófagos y produce un aumento de producción de AGER (289,290).

En estudios animales, se ha comprobado la presencia de AGER en distintos tipos celulares tales como: células endoteliales, de músculo liso, fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos, observándose unos niveles significativamente mayores en los modelos de animales diabéticos frente a sus controles sanos (291). En términos de procesos fisiopatológicos en humanos, se ha descrito la participación de AGER en varias enfermedades, incluyendo la aterosclerosis y microangiopatía diabética, enfermedad de Alzheimer, desórdenes inmunes e inflamatorios y varios tipos de cáncer (292).

Los efectos más relevantes de los AGEs sobre el sistema vascular en la diabetes mellitus se reflejan en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos relevantes de los AGEs en enfermedades vasculares y Diabetes Mellitus (111).

Estabilización del colágeno, confiriéndole alta resistencia a la colagenasa
Aumento de la formación de matriz vascular y el estrechamiento de la luz del vaso
Aumento de la deposición de la membrana basal
Hipertrofia glomerular y glomeruloesclerosis
Aumento de la secreción de matriz mesangial
Deterioro de la heparansulfatoproteoglicanos unidos a la matriz
Aumento de la permeabilidad endotelial
Inducción de citoquinas y factores de crecimiento (i.e IL-1alfa, TNF, IGF-IA, PDGF) por los monocitos/macrófagos seguida por la proliferación de células vasculares
Inducción de la proliferación de células del músculo liso
Inducción de la proliferación de fibroblastos
Estimulación de células T y la inducción de la síntesis de interferón gamma
Inducción de AGER, uno de los receptores conocidos para AGEs
Inducción de la unión de eritrocitos cargados de AGEs a las células endoteliales
Pérdida de actividad mitogénica de células endoteliales debido a cambios en bFGF
Inducción de la síntesis autocrina del VEGF
Aumento de la actividad procoagulante (i.e., Tissue Factor expresión)
Deterioro de la actividad anticoagulante (i.e. la expresión de trombosmodulina)
Inducción de moléculas de adhesión (i.e VCAM-1)
Inducción del polipéptido quimiotáctico JE/MCP-1 en células musculares lisas.
Inducción de la quimiotaxis de células mononucleares, la activación y la migración transendotelial
Deterioro de los efectos vasodilatadores del NO
Aumento de la vasoconstricción por la inducción de la endotelina-1
Inducción de estrés oxidativo intracelular y la activación del factor de transcripción NF-kappa B
Peroxidación lipídica
Reducción de los mecanismos de defensa antioxidantes intracelulares (i.e. GSH o vitamina C)
Aumento de la captación de AGE-LDL por los macrófagos y posible formación de ateroma
Activación del complemento por la captura de moléculas no-AGE
Aumento de la tasa de mutación del ADN

6.4.4 Efectos de la unión AGEs-AGER sobre el tejido óseo

En el esqueleto, altas concentraciones de AGEs, actuando sobre su receptor (AGER), pueden tener un efecto negativo a través de varios mecanismos. A nivel celular, la unión de AGEs con sus receptores no sólo activa la degradación de éstos, sino también diversas rutas de transducción de señales intracelulares que contribuyen al desarrollo de enfermedades vasculares y complicaciones de la DM, como la microangiopatía y

macroangiopatía y sus repercusiones (293, 294). La unión AGEs-AGER en células de estirpe osteoblástica produce una reducción de los mecanismos de defensa antioxidantes y un aumento de la síntesis de radicales libres de oxígeno y de la expresión de RANKL, lo que promueve la diferenciación y activación de osteoclastos (295), e induce la apoptosis osteoblástica (296). Además, niveles elevados de AGEs alteran la mineralización y la reparación de microdaños en el tejido óseo, por la ya comentada formación de los enlaces cruzados en el colágeno, lo que altera la mecánica ósea (280).

En la figura 6.5, se encuentran resumidos los efectos la hiperglucemia y AGEs sobre la biología celular del tejido óseo.

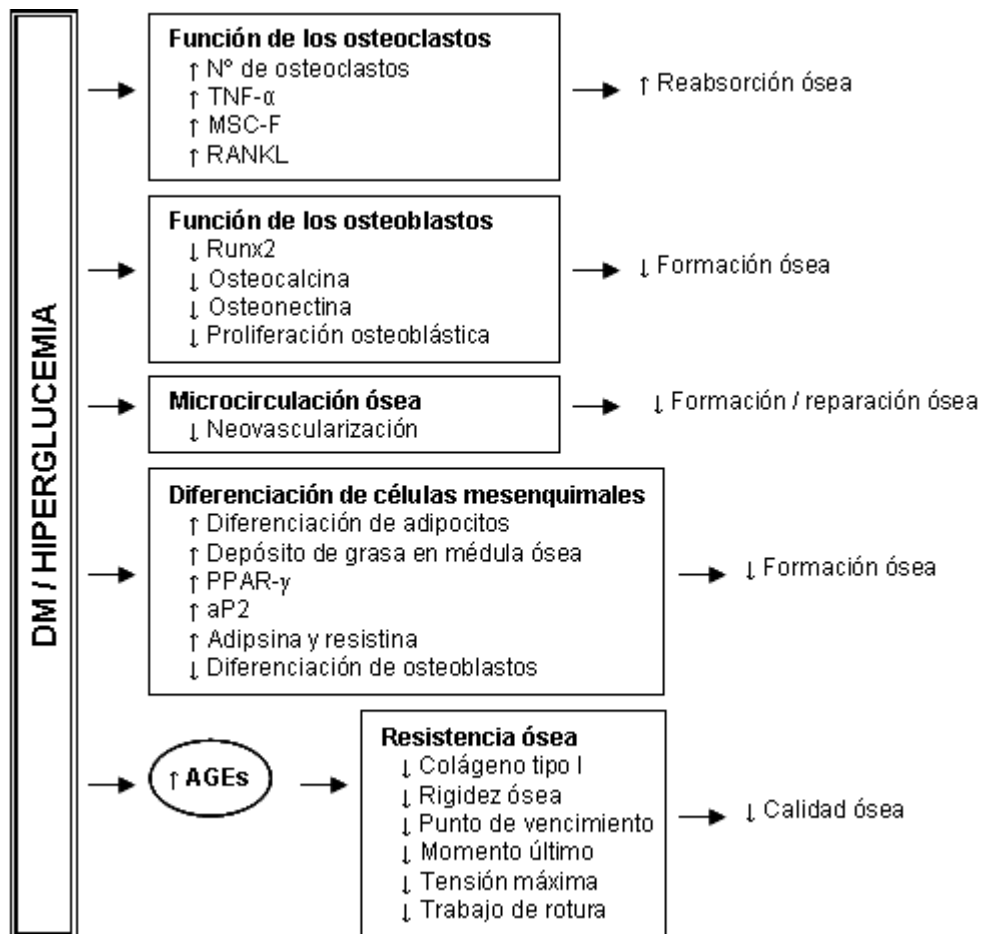


Figura 6.5. Efectos negativos de la DM y la hiperglucemia sobre el metabolismo óseo. (297)

Por una parte, la DM/hiperglucemia estimula la producción del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), TNF-alfa y RANKL, que activan la proliferación y diferenciación osteoclástica. Además la DM/hiperglucemia suprime la proliferación y función osteoblástica, en parte, por la disminución de la expresión de genes como Runx2, OCN y osteopontina (OPN).

Por otro lado, la diferenciación adipogénica se ve aumentada, como indican la sobreexpresión de marcadores como PPARgamma, la proteína de unión de ácidos grasos del adipocito (aP2), adiposina y resistina. Otro aspecto que se ve afectado es la neovascularización, lo cual repercute en la formación y reparación del hueso.

Finalmente, el aumento de los AGEs afecta negativamente a la mecánica del hueso, disminuyendo así su calidad. Todo ello podría resultar en fracturas óseas de bajo impacto o por fragilidad. (297)

6.4.5 Efecto de las terapias antidiabéticas sobre el hueso

Algunos de los fármacos más comunes empleados en el control de la enfermedad diabética, también ejerce diversos efectos sobre el metabolismo óseo (Figura 6.6).

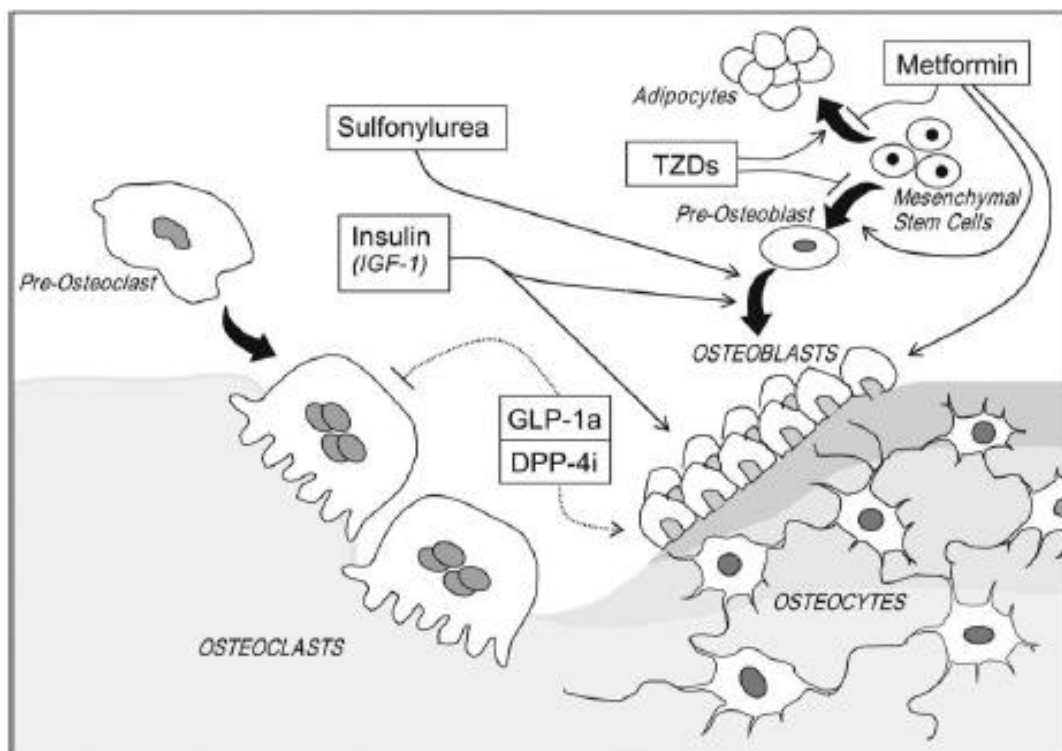


Figura 6.6. Acción de los distintos fármacos antidiabéticos sobre el metabolismo óseo.

La metformina, según se desprende de estudios clínicos, disminuye el riesgo de fracturas en un 20% (298), lo cual se cree que se debe, según se deriva de los estudios in vitro, al efecto osteogénico del fármaco, que estimula la proliferación y diferenciación de células de linaje osteoblástico y además previene el efecto negativo de los AGESs (299,300).

A las sulfonilureas también se les adjudica un efecto directo positivo sobre el metabolismo óseo, como lo demuestran estudios epidemiológicos (298). En estudios realizados in vitro, Glimpiride indujo la proliferación y diferenciación de osteoblastos de rata, vía activación de la oxido nítrico sintasa endotelial (301). Además la Glipizida y Glibenclamida aumentaron la secreción de osteocalcina inducida por 1.25 (OH)₂ D₃ en relación directa a la dosis empleada (302). En humanos, la información que existe es limitada. En el estudio ADOPT, el uso de gliburide durante un año se asoció con ligeras pero significativas alteraciones del remodelado óseo, más intenso en mujeres que en varones (303). En un estudio de cohorte realizado en Japón que comprende 838 personas con DM tipo 2, el uso de sulfonilurea se asoció a una disminución de la prevalencia de fractura vertebral en mujeres (Odd ratio 0.48, p=0.018), pero no en hombres, incluso después de ajustar por DMO de columna lumbar (304).

Otros estudios han mostrado resultados discordantes, pues mientras datos existentes en población de Dinamarca concluyen que las sulfonilureas reducen el riesgo de fractura (305), una cohorte de Rochester no encuentran ventaja alguna con el uso de estos fármacos (306). Existe una revisión sistemática que concluye que no existe incremento ni disminución del riesgo de fractura en pacientes en tratamiento con sulfonilurea (307).

Las Tiazolidinedionas (TZD) son agonistas de PPAR-gamma que alteran la transcripción de genes que modulan el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, resultando en una disminución de la resistencia a la insulina, acción principal de este tipo de fármacos y que justifica su uso.

En el momento actual, está claramente establecido que estos agentes tienen un efecto negativo sobre el hueso, existiendo bastantes datos acerca de los mecanismos que llevan a ello (308).

Los estudios iniciales ya mostraron que la activación de PPAR-gamma favorece la adipogénesis desde las células mesenquimales, suprimiendo la diferenciación hacia osteoblastos (309-310). Estudios posteriores han abundado en este hecho, pero han mostrado, además, que la activación de

PPAR gamma hace que se estimule la diferenciación de células madre hematopoyéticas hacia osteoclastos, incrementándose la resorción ósea (311). Además, las tiazolidinedionas pueden ejercer acciones sobre el esqueleto a través de mecanismos indirectos, como la alteración en la expresión y secreción de adipocinas (adiponectina y leptina) y/o reducción de los niveles circulantes de insulina, ILGF-1 y amilina (312). Los ensayos farmacológicos han confirmado estos hallazgos, demostrándose que el tratamiento con tiazolidinedionas causa pérdida ósea en ratones y ratas (311,313,314), con un efecto predominante sobre la resorción ósea en ratones de mayor edad y una acción supresiva de la formación ósea en ratones jóvenes. Los estudios realizados en humanos en relación a los cambios producidos por TZD en los marcadores del remodelado óseo han sido variables (315-319). Sin embargo la mayoría de los estudios han mostrado un claro descenso de DMO con el uso de Roxiglitazona (320,321,315,316,322) y descenso (323-325) o no cambio (318,319) con Pioglitazona. Un reciente meta-análisis (326) demuestra una reducción significativa de la DMO en columna lumbar, cuello femoral y cadera total, en mujeres y cambios de una magnitud similar en un estudio realizado en hombres.

En relación a las fracturas existen estudios que demuestran que el uso de roxiglitazona aumenta la incidencia de las mismas. En efecto, en el estudio ADOPT, controlando a 4360 pacientes, encuentran que después de un seguimiento de 4 años el uso de roxiglitazona duplicó el riesgo de fractura (327). El estudio RECORD, muestra resultados similares. En un meta-análisis reciente, que incluye a 24544 participantes de 22 ensayos clínicos controlados, con 896 fracturas, se observa un aumento de incidencia de fractura con el uso de TZD en mujeres (OR 1.94, 95%IC 1.60-2.35; $p < 0.001$), pero no en hombres (328). El riesgo fue similar con roxiglitazona y pioglitazona. Otros estudios (329,330) muestran resultados bastante similares. En resumen, el uso de TZD se asocia con cambios variables de los marcadores del remodelado óseo, reducción significativa de la DMO y aumento del riesgo de fractura; estos efectos se producen a través de mecanismos que incluyen la inhibición de la diferenciación osteoblástica, aumento de la osteoclastogénesis y la modulación de los niveles circulantes de hormonas y adipocinas con influencia sobre el metabolismo óseo.

En relación al uso de insulina, dos estudios epidemiológicos importantes han comunicado resultados conflictivos (331-332). En un estudio danés de

casos y controles (331), el tratamiento con insulina no parecía afectar la incidencia de fracturas, mientras que en un estudio italiano se sugería un incremento en mujeres pero no en hombres (332). En cualquier caso, al hacer un seguimiento más largo, seleccionando únicamente a pacientes en tratamiento durante más de tres años, en ambos estudios se concluye que la insulina no aumenta el riesgo de fractura.

Respecto a los incretínmiméticos (GLP-1) hay que señalar que no conocemos datos publicados acerca de su acción sobre el remodelado óseo o DMO en humanos, aunque existen algunos estudios experimentales. En relación a la aparición de fracturas, existe dos meta-análisis importantes. En el primero (333) no se objetiva cambio alguno en el riesgo de fractura, mientras que en el segundo, más amplio, que comprende 16 ensayos clínicos aleatorizados y 11206 pacientes (334), el tratamiento con Liraglutide se asoció con una reducción significativa del riesgo de incidencia de fracturas (OR; 0.38 95%IC 0.17-0.87), mientras que el Exenatide se asoció con un aumento del riesgo (OR 2.09; 95%IC 1.03-4.21).

Existen algunos estudios acerca de la posible relación entre el uso de inhibidores de DPP-4 y riesgo de fractura. En 2011 se publica un meta-análisis que sugiere que podrían estar asociados a una disminución de riesgo (335), aunque nuevos trabajos (336-337) no encuentran esta diferencia. En un estudio de cohorte poblacional amplio, publicado recientemente (338) y que comprende a más de 215000 pacientes diabéticos del Reino Unido, no se encuentra diferencias en el riesgo de fractura entre los tratados con inhibidores de DPP-4 y otros agentes hipoglucemiantes (HR ajustado 1.03; 95%IC 0.92-1.15), ni con los controles no diabéticos (HR 0.89; 95%IC 0.71-1.13). En este estudio, ni la dosis diaria ni la cantidad total acumulada del inhibidor de DPP-4 se asoció con riesgo de fractura, si bien es cierto que el tiempo medio de tratamiento (1.3 años), puede resultar muy corto para demostrar tal asociación.

Finalmente, sólo unas líneas en relación a los recientes inhibidores del cotransportador sodio-glucosa a nivel renal (SGLT2), que promueven la excreción urinaria de glucosa, contribuyendo así al control metabólico en los pacientes diabéticos. Algunos estudios (339-340) han sugerido una alteración de los marcadores de remodelado óseo y en un análisis global de 8 ensayos clínicos se ha encontrado que el uso de canogliflozina se asocia a

una mayor incidencia de fractura de miembros superiores (341). De todas formas, debido a la escasez de datos disponibles y al corto seguimiento, podemos concluir que en el momento actual se desconoce el verdadero impacto de este grupo de fármacos sobre el esqueleto, requiriéndose estudios adicionales realizados a más largo plazo.

7. CÉLULAS PRECURSORAS DE ESTIRPE OSTEABLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA

7.1 Introducción

Como se ha comentado en apartados anteriores, la Diabetes Mellitus afecta negativamente al funcionamiento de distintos órganos y existe evidencia cada vez más clara de su efecto negativo sobre el hueso.

Efectivamente, el riesgo de fractura osteoporótica se multiplica por 6 en la Diabetes Mellitus tipo 1 y aumenta un 50% en la DM tipo 2, a pesar de que los pacientes con DM tipo 2 no tienen una disminución de la masa ósea.

Una de las alteraciones repetidamente encontradas es que los pacientes con DM tienen una disminución en el nivel de formación ósea, sin que se conozca con exactitud los mecanismos íntimos que llevan a esta alteración. Durante los últimos años se han acumulado evidencias de la existencia de células precursoras osteogénicas, de extirpe osteoblásticas, en sangre periférica, y que estas células podrían contribuir a la formación de hueso.

Existen trabajos que demuestran que estas células se incrementan durante el crecimiento puberal y que pueden ser atraídas a los lugares donde ocurre una fractura (342).

Efectivamente, hasta el año 2005 se conocía que los precursores de osteoclastos pueden detectarse en la circulación periférica y que estas células son capaces de viajar a distancia, a lugares donde se desarrolla el remodelado óseo. Sin embargo, no se conocía si un proceso paralelo ocurre con las células de extirpe osteoblástica; es decir, si salen a la circulación periférica donde pudiesen ser detectadas y desde aquí viajar a los focos donde se esté desarrollando el remodelado óseo.

Es cierto que en algún trabajo previo (343) y (344) se había comunicado la existencia en circulación periférica de células adherentes al plástico (extirpe osteoblástica en especies en animales inferiores), pero había fallado su búsqueda en adultos humanos, ya que sólo aparecían $1/10^8$ células mononucleares periféricas. Hubo que esperar hasta que apareció la publicación de Dominici M y cols en 2004 (345), donde se mostraba que

existen células en la médula ósea que no se adhieren al plástico, que tienen capacidad de reproducirse en médulas de ratón irradiadas y que su concentración es 10 veces mayor que la de las células adherentes. Ésto llevó a pensar que los experimentos previos, buscando en sangre periférica exclusivamente las células que se adherían al plástico, desperdiciaban un número importante de las mismas, justificando que no se encontrasen estas células de extirpe osteoblástica en sangre periférica.

Los autores de la Clínica Mayo (342) razonaron que si usaban citometría de flujo con anticuerpos específicos para las proteínas existentes en las células osteoblásticas, como osteocalcina y fosfatasa alcalina, podrían identificar mucho mejor las células de esta extirpe, en caso de que existiesen en la circulación periférica. Ellos, además, pensaron que si estas células de extirpe osteoblástica en la sangre periférica jugaba algún papel fisiológico en la formación ósea, su concentración sería mayor en circunstancias donde la formación ósea está aumentada, como sucede durante la fase de crecimiento. Por ello, determinaron la concentración de estas células en circulación periférica de hombres adultos y en niños adolescentes en periodo de máximo crecimiento durante el desarrollo puberal. Estudiaron 11 sujetos adultos, entre 28 y 49 años de edad, y 11 adolescentes entre 13 y 15 años de edad. Con técnicas de citometría de flujo y anticuerpos antiosteocalcina, valoraron el porcentaje de células de extirpe osteoblástica en sangre, y estudiaron, además, los niveles séricos de osteocalcina, fosfatasa alcalina ósea, IGF-1 e IGF-BP3. Encontraron que existían células de extirpe osteoblástica en sangre periférica humana, tanto en adolescentes como en varones adultos, en una proporción media cercana al 1% de las células mononucleares periféricas en adultos y más del 5% en adolescentes durante el periodo de crecimiento. Además, encontraron una correlación positiva entre la concentración de estas células y los niveles séricos de osteocalcina, IGF-1 y FA. Estos datos demuestran, por primera vez, la existencia de células precursoras de extirpe osteoblástica en sangre periférica humana y hacían sospechar que muy posiblemente tendrían un papel en la formación ósea (desplazándose hasta las unidades de remodelado óseo), deducido del hecho de que su número fuese 5 veces más elevado en jóvenes durante la fase de desarrollo puberal y crecimiento rápido, junto a la existencia de una correlación entre el número de células y otros parámetros de crecimiento óseo, como son los niveles séricos de OCN, FA y IGF-1.

Otros marcadores de superficie celular pueden también usarse para caracterizar a estas células. Por ejemplo, CD34, que es un marcador de células madres, identifica a aquellas células que van a dar lugar a

osteoblastos capaces de formar nódulos mineralizados y que pueden intervenir en la cicatrización de fracturas. Otro marcador usado, CD 146, caracteriza a células precursoras del estroma de la médula ósea, pericitos y células hematopoyéticas que se autorrenuevan para dar lugar a progenitores de células óseas. Las células positivas para CD34 o CD146, son más inmaduras que las que resultan positivas sólo para osteocalcina, ya que esos marcadores desaparecen conforme se forman los osteoblastos maduros. (346-348).

7.2 Origen celular y tisular de las células circulantes osteogénicas

Está ampliamente aceptado que las células precursoras osteogénicas (CPOs) tienen su origen en la médula ósea, ya que estas células expresan marcadores de células hematopoyéticas, sin embargo existen dudas de cuál es la célula madre que da origen a las CPOs. Pignolo RJ y cols (349) consideran plausible que las CPOs sean representantes de un número de poblaciones celulares que se expanden para dar fenotipos que varían desde células hematopoyéticas a células de estroma adherentes al plástico, con distintas formas intermedias. Los autores sugieren la posibilidad que estas poblaciones celulares adquieran distinto grado de maduración a partir de células hematopoyéticas/células madres del estroma de la médula ósea. Ellos hipotetizan que las MSC adherentes al plástico son una de las primeras poblaciones celulares que se movilizan a la sangre periférica bajo determinadas condiciones fisiopatológicas (hipoxia, injuria tisular o fractura) o por efecto directo o indirecto de agentes farmacológicos (sustancia P). Por otra parte, las células madres hematopoyéticas pueden dar lugar a fibrocitos y/o células vasculares bajo las mismas condiciones de estrés.

Durante el crecimiento, las células pueden acudir por la señal de estrés que supone un microambiente hipóxico en la metafisis de los huesos largos. Así, los niveles elevados de CPOs durante el crecimiento puberal puede explicarse por la formación del gradiente de oxígeno que se produce durante un modelado intenso, llevando a estas células precursoras hasta el esqueleto donde pueden funcionar como osteoblastos maduros. En individuos predispuestos a una osificación patológica, la injuria tisular es el factor precipitante, como sucede en la osificación heterotópica postraumática o a nivel microscópico en el caso de la disfunción endotelial, que acelera y/o precipita la calcificación y osificación vascular. El eje SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) / CXCR4 puede ser el camino final común para movilizar a las células progenitoras de la médula ósea en respuesta a la

hipoxia, a péptidos angiogénicos, citoquinas inflamatorias o a la injuria tisular. Este eje se ha implicado en procesos tan diversos como el desarrollo, la regeneración y la tumorigénesis/metástasis. No sorprende entonces, a juicio de estos autores, que el mismo mecanismo esté implicado en la movilización de las CPOs para que acudan al lugar donde se las necesita. Ello indicaría que la emigración de estas células precursoras osteoblásticas a sangre periférica y de aquí a los tejidos donde hacen su acción depende, no solamente de la plasticidad de las mismas, sin también de los estímulos del microambiente en el que finalmente residan.

7.3 Papel fisiológico y fisiopatológico

Aunque las funciones de estas células precursoras osteogénicas (CPOs) permanecen sin ser bien conocido, una posible función incluye la formación ósea durante el periodo de cicatrización de las fracturas. Así Eghbli-Fatourehchi y cols. (342) demostraron que las CPO no sólo aumentan durante el crecimiento puberal, sino que también aumentan durante el periodo posterior al sufrimiento de una fractura. Se ha demostrado la presencia de células precursoras osteoblásticas y adherentes al plástico (MSC-like, CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD14-) en el 22% de pacientes con fractura de cadera y en el 46% de pacientes más jóvenes con otro tipo de fracturas, mientras que no se han encontrado en ninguna paciente con artrosis de cadera (350). También existen estudios animales que dan soporte a los hallazgos mencionados en humanos. Valorados en conjunto todos estos datos son consistentes con la idea de que las células precursoras osteoblásticas (CPO) se movilizan a los lugares donde ha ocurrido una fractura para contribuir a la osteogénesis necesaria en las primeras etapas de su cicatrización.

Estas células han sido también implicadas en otros procesos fisiopatológicos, como la osificación extraesquelética que puede ser encontrada en lugares tan variados como pulmón, vasos sanguíneos, corazón y tejidos periarticulares. Se está acumulando evidencia de que estas células pueden participar en la osificación heterotópica que sigue a la artroplastia de cadera, en la estenosis valvular aórtica degenerativa y calcificada del anciano y en modelos animales de formación ósea ectópica (351-352).

Previamente se pensaba que el proceso de la calcificación vascular era el resultado de un depósito pasivo de calcio en la pared de la arteria, pero actualmente sabemos que es un proceso fisiopatológico activo de una formación ósea “de novo“. Distintos tipos de células con potencial de

mineralización han sido aislados del tejido vascular: pericitos en la microcirculación, células calcificantes en la íntima y miofibroblastos en la adventicia, aunque aún se desconocen aspectos importantes del mecanismo íntimo de estas calcificaciones (353-355).

La osificación está presente en un 15% de pacientes a los que se les realiza endarterectomía carotídea y en la estenosis valvular aórtica. La existencia de COPs en pacientes con enfermedad valvular aórtica de larga evolución sugiere que, estas células están implicadas en el proceso; esta observación está también refrendada por publicaciones que muestran que los niveles de células OC+ están elevadas en pacientes con enfermedad arterial periférica y el hecho de que la expresión de osteocalcina en células precursoras de endotelio es alta en pacientes con enfermedad arterial coronaria (356).

Las lesiones osificadas en el lecho vascular se desarrolla cuando existe injuria e inflamación, sugiriendo que la osificación ectópica donde participan las COPs, se inicia siempre a consecuencia de las mismas alteraciones (lesión e inflamación), independientemente del lugar donde estos hechos se produzcan.

El desplazamiento de las CPOs desde la médula ósea al lugar periférico donde se necesiten, puede deberse a un mecanismo en el que se involucran mediadores de inflamación e hipoxia. Durante el crecimiento, el aumento de células osteogénicas precursoras pueden explicarse por el gradiente de oxígeno creado por el intenso remodelado y como sugiere Canalis (357) estas células llegan al esqueleto donde pueden funcionar como osteoblastos maduros. En personas predispuestas a formar osificaciones patológicas, es el daño microscópico el que estimula a estas células, como sucede en el caso de la disfunción endotelial precoz a la que posteriormente puede asociarse calcificación y osificación de la pared vascular.

Recientemente se ha objetivado la capacidad de los precursores osteogénicos circulantes para acudir al foco de fractura, demostrándose que durante la formación del callo de fractura hay una gran variación interindividual en la cantidad de osteoblastos y precursores osteoclasticos (358). Estos autores vieron que estas células se movilizan y contribuyen a la reparación de la fractura. Se ha descrito que en pacientes con osteoporosis postmenopaúsica y fractura, existe una disminución de este tipo de células durante el periodo de formación del callo de fractura, al tiempo que las células son más maduras (359).

Se conoce que la Teriparatide (1,34- rhPTH) es un tratamiento útil de la osteoporosis postmenopausica, reduciendo de manera significativa el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales (360-361).

Este tratamiento anabólico estimula tanto la formación de hueso cortical y trabecular, resultando en una mejoría de la microarquitectura ósea. La PTH actúa directamente sobre las células de extirpe osteoblástica, uniéndose a receptores específicos; estos receptores también se han encontrado en las células FA+ de la medula ósea (362). De esta manera, la PTH activa genes importantes para las funciones de los osteoblastos maduros, incrementa su número, disminuye la apoptosis de los mismos y producen un aumento de actividad.

Merece la pena destacar el trabajo de D'Amelio P y cols (363). Ellos estudian 15 mujeres con OP postmenopausica (DMO < -2.5 T score) sin fracturas y 10 con fracturas. Las pacientes con fracturas fueron aleatorizadas para recibir tratamiento con 60mg/día de raloxifeno + 800UI/día de vitamina D y 1200 mg/día de calcio (5 pacientes) o Teriparatide 20mcgr/día + la misma cantidad de vitamina D y calcio del grupo de raloxifeno (5 pacientes). Las pacientes con fracturas fueron todas tratadas con Teriparatide más calcio y vitamina D.

Encontraron que existía un aumento de precursores periféricos OC+ y OC+ / FA+ en las pacientes con fracturas mientras que las células circulantes eran más maduras en los pacientes sin fractura. Por otro lado, se demuestra que el tratamiento con Teriparatide produce un incremento en la maduración de las células precursoras, igual que produce aumento de función de los osteoblastos maduros. Ello hace pensar que la Teriparatide facilita la función de estas células en el foco de fractura y ayuda a la consolidación del callo, mejorando el restablecimiento de la integridad anatómica y funcional del hueso.

En el momento actual, podemos vislumbrar que aunque las células precursoras osteogénicas participen en la formación ósea, no sea ésta su única función, sino que actúen de modo general como una respuesta adaptativa a condiciones de daño y/o inflamación. Estas células pueden participar en la regeneración tisular dependiendo del microambiente, como sucede en calcificaciones extraesqueléticas. Pueden ser, potencialmente, útiles en protocolos terapéuticos para aumentar formación, remodelado o regeneración, así como ser usadas en pruebas diagnósticas basadas en los niveles de CPO como marcadores en distintos procesos patológicos.

7.4 CPOs en las DM tipo 2

En el año 2012 se publica el primer trabajo (único hasta el momento) de los niveles de CPO en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Manavalan J.S y cols (364) hipotetizan que la disminución de formación ósea que existe en los pacientes con DM tipo 2 se asocia con un retraso en el desarrollo de osteoblastos. Para comprobar su hipótesis estudian los niveles de CPOs en sujetos con DM tipo 2, junto a la medida de parámetros bioquímicos, histomorfométricos e índices moleculares de formación ósea así como marcadores de estrés oxidativo en las COPs, ya que la disminución de la osteoblastogénesis ha sido asociada al incremento del estrés oxidativo.

Estudian 18 pacientes de DM tipo 2, con una duración de la DM de 9 ± 6 año y 27 controles, con una edad media de 58 años. Todas eran mujeres con al menos 5 años desde la menopausia, tomando como criterios de exclusión un filtrado glomerular menor de $60 \text{ ml / min } \times 1.73 \text{ m}^2$, la terapia con rosiglitazona y pioglitazona, el padecer algún trastorno del metabolismo mineral u óseo (hiperparatiroidismo primario, enfermedad de Paget, osteomalacia u osteogénesis imperfecta), función tiroidea anormal, historia de síndrome de Cushing, tratamiento con corticoides durante más de tres meses en los últimos tres años, trastornos de absorción intestinal y uso de cualquier medicación con efecto sobre el metabolismo óseo. Se valoró el porcentaje de células periféricas de extirpe osteoblástica por citometría de flujo con anticuerpos antiosteocalcina y utilizándose antiCD 146 como marcador celular de preosteoblastos más inmaduros, dividiéndose las células en OCN+ / CD146 + y OCN+ / CD146-. Se separó RNA y se obtuvo DNA complementario para análisis de PCR en tiempo real, valorándose la expresión del marcador génico osteoblástico Runx2 en las células OCN+ / CD146+ y en las OCN+ / CD146-. También se valoró la expresión de otros genes, como receptor de insulina, GLUT1, p66 (marcador de estrés oxidativo) y SOD2 (superóxido desmutasa – enzima con capacidad antioxidante). Finalmente, se estudiaron los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, DMO y parámetros de histomorfometría ósea.

El porcentaje de de células circulantes con expresión de OCN en su superficie (OCN+) fue significativamente más bajo en los pacientes con DM 2 que en las mujeres controles (0.8 ± 0.2 vs 1.6 ± 0.4 %, $p < 0.0001$).

Sin embargo, el porcentaje de células que, además de osteocalcina, expresaban el marcador de estadios más precoces de maduración (CD146+), era mayor en las pacientes diabéticas que en las controles (33.3 ± 7 vs $12\pm 4\%$, $p < 0.0001$) (Figura 7.1).

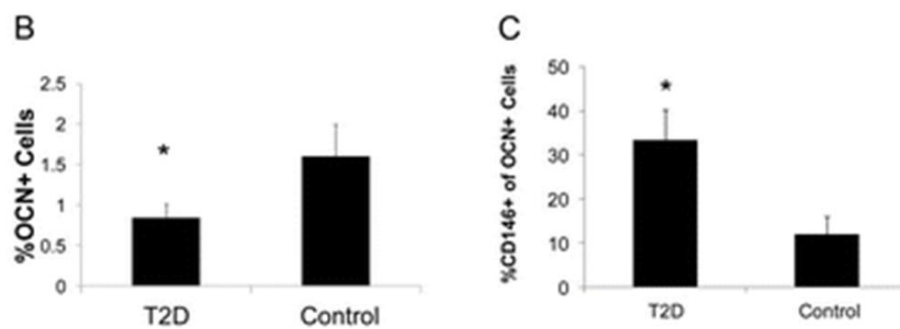


Figura 7.1. Porcentaje de células periféricas OCN+ (B), y OCN+/CD146+ (C) en pacientes con DM tipo 2

Los niveles de HbA1c mostraron una correlación inversa con el porcentaje de células OCN+ ($r = -0.49$; $p = 0.001$) cuando se incluían a la totalidad de las mujeres (diabéticas más controles) mientras que en el grupo de las mujeres diabéticas la correlación fue pequeña ($r = 0.12$) y no significativa. La expresión de Runx2 estaba disminuida en las diabéticas mientras que estaban aumentadas las expresiones de SOD2 y p66, con correlación positiva con el tiempo de duración de la enfermedad.

Las pacientes diabéticas tenían niveles séricos más bajos de P1NP y osteocalcina, demostrando su menor formación ósea. Los niveles de HbA1c también se correlacionaron inversamente con los de P1NP, OCN y los índices histomorfométricos de formación ósea (O.Th, MS/BS, MAR, BFR/BS, OS/BS, Ob.S/BS).

Los hallazgos de este primer trabajo en pacientes con DM tipo 2 demuestran el efecto nocivo de la DM tipo 2 sobre el hueso, al objetivarse no sólo una disminución de los parámetros bioquímicos e histomorfométricos de formación ósea, sino también, reducción clara en el número de CPOs OCN+, lo que apoya el potencial osteogénico de estas células circulantes.

No existe trabajo donde se estudie el nivel de células periféricas de estirpe osteoblástica (OCN+) en pacientes con DM tipo 1, en quienes son mayores las alteraciones de la masa ósea y el riesgo de fractura.

7.5 Contribución de las células progenitoras circulantes a las complicaciones de la Diabetes Mellitus.

La DM se asocia con complicaciones importantes en muchos órganos y tejidos, a través de la producción de macro y microangiopatía, con profundos cambios en el endotelio y músculo liso vascular, con la consiguiente modificación de la matriz extracelular. La DM incrementa tremendamente el riesgo de enfermedad cardiovascular, produciendo precozmente una disfunción endotelial y posteriormente una aterosclerosis también precoz, que se ve favorecida por la asociación con otros factores de riesgo, como hipertensión arterial, obesidad y dislipemia. Pero ¿juegan algún papel las células progenitoras circulantes en estas complicaciones?.

7.5.1 La plasticidad de las células progenitoras circulantes.

En el organismo adulto, la médula ósea representa el lugar donde se desarrolla la hematopoyesis al mismo tiempo que sirve de reservorio a células progenitoras. En los últimos años hemos aprendido que estas células progenitoras pueden dar lugar a distintas líneas celulares, además del sistema hematopoyético. Estas células pueden abandonar la médula ósea, respondiendo a determinados estímulos y emigrar a órganos periféricos a través de la circulación. Estas células inmaduras mantienen la capacidad de diferenciación en distintas líneas celulares, siendo la forma mejor conocida de este fenómeno la diferenciación endotelial a través de células progenitoras endoteliales (CPE). Estas células son capaces de diferenciarse en células endoteliales y participan en la reparación del endotelio y en neoangiogénesis. Las CPEs circulantes pueden aislarse por citometría de flujo a través de su expresión de CD34 y/o CD33, además de otros marcadores endoteliales como KDR. Estas células se movilizan desde la médula ósea en respuesta a muchos estímulos, tales como la isquemia tisular, citoquinas y factores de crecimiento. Una vez en la circulación se

dirigen específicamente a los lugares de daño vascular a fin de reparar el endotelio dañado y restaurar el flujo sanguíneo. Las CPE se encuentran muy alteradas en la DM (365) justificando al menos en parte la elevada prevalencia de riesgo cardiovascular asociado a la misma.

7.5.2 Células osteoprogenitoras y complicaciones cardiovasculares de la Diabetes Mellitus.

La calcificación ectópica es un signo fundamental de la vasculopatía diabética. La calcificación puede desarrollarse en la media o en la neointima de las placas de ateroma. La calcificación de la media lleva a endurecimiento y rigidez de la pared arterial, así como a elevación de la presión arterial, mientras que la calcificación neointimal puede desestabilizar la placa, haciéndola vulnerable y llevándola a la ruptura o hemorragia. Los tipos de células vasculares que dan lugar a las células calcificadas no se conoce en su totalidad, estando envueltas posiblemente células de músculo liso, pericitos y progenitores de la adventicia. Datos recientes (366), demuestran que las células osteoprogenitoras circulantes (CPOs) contribuyen a la calcificación de las placas arteriales, habiéndose demostrado también que estas células y las EPCs (endothelial precursor cells) pueden expresar proteínas óseas, como osteocalcina y fosfatasa alcalina, desarrollando tendencia a formar nódulos calcificados (367).

Estas células están elevadas en pacientes con enfermedad arterial coronaria y existen datos en humanos que sugieren que ellas van desde la circulación hasta depositarse en las arterias enfermas; la expresión de osteocalcina en las EPCs se correlaciona con la rigidez arterial. Todo ello resalta el papel que pueden desempeñar las células circulantes de extirpe osteoblásticas y las EPCs en la patología arteriosclerótica.

Recientemente se ha publicado que el tratamiento con bifosfonatos (risedronato) produce una disminución significativa en genes de diferenciación y proliferación osteoblásticas en EPCs, con tendencia a la disminución de la expresión de osteocalcina, sugiriendo un posible mecanismo por el que los bifosfonatos pueden ser de utilidad para inhibir la calcificación vascular (368).

En 2006 se comunicó, por vez primera, que la movilización de células progenitoras de la médula ósea estimulada por isquemia o G-CSF estaba disminuida en animales diabéticos en comparación a controles (369), hecho que ha sido confirmado por otros autores. También se ha demostrado una microangiopatía en la médula ósea del diabético, con signos semejantes

a los que se producen en la microcirculación de otros territorios, y que puede afectar a la formación y movilización de células precursoras. Estas alteraciones pueden desarrollarse precozmente, , habiéndose encontrado ya una disminución de células de CD34+ en estado de prediabetes.

A. J. Flammer y cols (370), conociendo el aumento de células circulantes con capacidad osteogénica en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, como se ha señalado en párrafos anteriores, hipotetizan que las EPCs, coexpresando osteocalcina, pueden también estar aumentadas en un estadio muy precoz de la enfermedad, y detectarse en el estadio de prediabetes. Ellos estudian a 133 pacientes con una edad de 57.4 ± 15.7 , dividido en dos grupos según que el nivel de HbA1c fuese mayor o menor de 5.6% (límite superior de la normalidad). Realizan citometría de flujo de células mononucleares periféricas, realizando recuento de: 1) células OCN+, 2) células con marcadores de EPC (CD34+/KDR+ y CD133+/CD34-/KDR+) y 3) células con marcadores de EPCs que también son OCN+. Encuentran que los pacientes con HbA1c por encima de 5.6%, tienen un porcentaje de células mononucleares periféricas OCN+ significativamente más elevado que los controles (4.6 [2.68-7.81 vs 3.12 [0.99-7.81] $p < 0.035$, mayor número de células OCN+/CD133+/CD34-/KDR+ ($p < 0.01$) y una fracción más elevada de células que expresan marcadores de EPC y al mismo tiempo son OCN+ ($p = 0.002$). Existe una correlación positiva entre los niveles de células circulantes OCN+/CD133+/CD34-/KDR+ y los niveles de HbA1c en el estado prediabético, incluso después de ajustar por la existencia de obesidad, otros factores de riesgo cardiovasculares y medicación ($p < 0.002$).

Se conoce, por tanto, que la diabetes mellitus tipo 2 cursa con aumento de células progenitoras endoteliales (EPCs) que comparten marcadores de extirpe osteoblásticas (OCN+), lo que puede tener un papel en la aterosclerosis y calcificación vascular, habiéndose demostrado estos cambios incluso en estadios más precoces (prediabetes).

8. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Hasta el momento actual no existe publicación alguna donde se haya estudiado las células circulantes de extirpe osteoblásticas (CPOs con marcador osteoblástico - OCN+) en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Este estudio, sin embargo, resulta sumamente interesante, ya que los

pacientes con DM1 tienen una masa ósea baja y un riesgo de fractura muy elevado, como ha quedado previamente reflejado, y las células circulantes de extirpe osteoblásticas pueden ayudar al mantenimiento de la masa ósea y especialmente a la regeneración del hueso cuando se ha producido una fractura. Por ello, en el presente trabajo nos hemos planteado llenar este vacío estudiando el número de células circulantes de extirpe osteoblástica en sangre periférica de pacientes con DM tipo 1 comparándolo con sujetos sanos, intentando relacionar su posible defecto con otros parámetros de masa ósea y grado de descompensación de la enfermedad diabética.

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Los pacientes con DM tipo 1 tienen una masa ósea baja y un incremento importante del riesgo de fracturas osteoporóticas. Las causas que justifican este deterioro del metabolismo óseo en el diabético son complejas y no totalmente conocidas en el momento actual. Conocemos que la insulina, a través de receptores específicos de la misma que existen en el osteoblasto, estimula la actividad de esta célula y la formación ósea. En la DM tipo 1, al existir un fracaso en la formación y secreción de insulina, aparece una merma en la actividad osteoblástica en las unidades de remodelado óseo.

Por otro lado, conocemos que células de extirpe osteoblástica circulan en sangre periférica y pueden tener un papel en la formación ósea, especialmente en la formación del callo tras una fractura. No existe trabajo que haya estudiado estas células periféricas en pacientes con DM tipo 1, por lo que no sabemos en el momento actual si se encuentran afectadas en esta patología metabólica y tampoco conocemos si su afectación puede estar en relación con la edad de comienzo de la diabetes, el grado de descompensación de la misma ni su relación con la masa ósea y otros parámetros del metabolismo óseo.

Por ello, nos hemos planteado el presente trabajo con la siguiente hipótesis:

- 1.- Los pacientes con DM tipo 1 tienen una disminución de células circulantes periféricas de extirpe osteoblástica.
- 2.- Esta disminución debe ser más evidente en el diabético durante el periodo de crecimiento, momento en el que existe más necesidad de actividad osteoblástica (formación ósea) para alcanzar el esqueleto adulto
- 3.- La disminución de células periféricas de extirpe osteoblástica en la DM tipo 1 se relaciona con el grado de descompensación de la diabetes y con la cantidad de masa ósea.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. Cuantificar el porcentaje de células precursoras de extirpe osteoblástica en sangre periférica de pacientes adultos con DM tipo 1 comparándolo con sujetos controles no diabéticos, equiparables en edad y sexo.
2. Cuantificar el porcentaje de células precursoras de extirpe osteoblástica en sangre periférica de paciente con DM tipo 1 durante la etapa de crecimiento, comparándolo con sujetos controles no diabéticos, equiparables en edad y sexo.
3. Valorar el grado de descompensación metabólica de la DM (niveles de glucemia y HbA1c) y su relación con las células precursoras.
4. Valorar la masa ósea (DMO) en columna lumbar y cadera, y otros parámetros del metabolismo óseo, estudiando su posible relación con la cantidad de células precursoras circulantes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características del estudio

El presente trabajo es un estudio de casos y controles. El trabajo fue aprobado por el comité ético local y todas las personas incluidas fueron informadas y firmaron el consentimiento, siendo respetados los principios éticos para la investigación en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki.

El protocolo de estudio ha incluido para todos los sujetos:

- Parámetros antropométricos
- Datos clínicos
- Determinaciones bioquímicas
- Determinaciones densitométricas
- Cuantificación de células precursoras de extirpe osteoblásticas en sangre periférica

2. Población estudiada

El tamaño muestral se ha calculado teniendo en cuenta el rango de variabilidad del porcentaje de células circulantes precursoras de OB en sujetos sanos y en un mini estudio piloto realizado en pacientes con DM 1. Esperamos encontrar una disminución de células precursoras de OB de una desviación estándar en los pacientes diabéticos, tanto en niños como en adultos, en relación a los controles de edad y sexo equivalentes.

Con esta premisa y considerando un nivel de confianza del 95% y una potencia estadística del 80%, se calculó un tamaño muestral de 16 controles y 16 pacientes diabéticos. Por diferenciar los sujetos adultos de los de edad infantil, nos propusimos el estudio de 80 pacientes repartidos en, al menos, 20 sujetos de los siguientes 4 grupos:

- Controles adultos
- DM 1 adultos
- Controles infantiles
- DM 1 infantiles

Finalmente se consiguió completar el estudio programado en 89 sujetos, divididos en los siguientes grupos:

- 23 niños DM1 (edad 6-15 años; media 10.3 ± 2.5 años)
- 21 niños controles (edad 4-12 años; media 9.2 ± 2.6 años)
- 18 adultos DM1 (edad 20-40; media 28.6 ± 5.3 años)
- 27 adultos controles (edad 24-36; media 28.7 ± 3.1 años)

Los pacientes diabéticos de edad adulta fueron reclutados en la consulta monográfica de DM tipo 1 del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Virgen Macarena y los diabéticos infantiles fueron reclutados en la consulta de diabetes de la Sección de Endocrinología del Servicio de Pediatría del mismo centro hospitalario.

Los controles adultos fueron reclutados, mayoritariamente, entre personal sanitario del centro. Los controles infantiles se reclutaron de niños sanos de una consulta de Pediatría general de un centro de salud.

Los pacientes diabéticos estaban todos bajo tratamiento insulínico y en los controles se descartó la presencia de diabetes mellitus y cualquier patología que pudiese afectar al metabolismo óseo.

2.1 Criterios de Inclusión:

1. Diabéticos adultos: diagnóstico de DM 1, en tratamiento insulínico, con función renal normal y edad comprendida entre 18-40 años.
2. Diabéticos infantiles: diagnóstico de DM 1, en tratamiento insulínico, con función renal normal y edad comprendida entre 4-15 años.
3. Controles adultos y niños de edad comparable a los grupos de diabéticos, con función renal normal.
4. Todos los participantes (pacientes y controles) debían aceptar el protocolo y firmar el consentimiento informado.

2.2 Criterios de Exclusión:

1. En todos los grupos de estudio eran criterios de exclusión los siguientes:
 - Tratamiento con fármacos de influencia sobre el metabolismo óseo (corticoides, anticonceptivos, glitazones, inmunosupresores, antirreabsortivos, estimulantes de formación ósea, tiroxina, anticonvulsivantes y anticoagulantes).

- Padecer alguna enfermedad endocrina o sistémica con influencia sobre el metabolismo óseo.
 - No firmar el consentimiento informado.
2. En los controles se consideró criterio de exclusión la existencia de Diabetes Mellitus, glucemia basal alterada y HbA1c > 5.8%.

3. Obtención de Muestras

3.1 Suero sanguíneo

- A todos los participantes se les realizó una extracción de sangre en ayunas, obteniendo suero para las determinaciones bioquímicas y utilizando el resto de la muestra (células) para la cuantificación de las células circulantes de extirpe osteoblástica (CPOs).

3.2 Determinación de densidad mineral ósea

- A todos los participantes se les realizó densitometría ósea de columna lumbar (L2-L4) y cadera (cadera total y cuello femoral) con Densitómetro Rx-doble haz, HOLOGIC, modelo Discovery

4. Datos clínicos

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica que incluía los siguientes puntos:

4.1. Datos de filiación y generales

- Nombre y Apellidos
- Dirección de domicilio actual
- Teléfono de contacto
- Número de historia clínica
- Número de la seguridad social
- Fecha de nacimiento
- Edad de la menarquia
- Tiempo de evolución de la enfermedad

4.2. Medidas antropométricas

- Peso (kg)
- Altura (cms)

- Índice de masa corporal (IMC) (Peso en kg/altura en metros²)

5. Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas, a partir de las muestras de suero, fueron realizadas en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla). Los parámetros que se determinaron fueron:

- Glucosa: se determinó en suero mediante el análisis en el Autoanizador (ADVIA 2400, Siemens) midiéndose en mg/dl, cuyo intervalo de referencia es 70-100mg/dl. La técnica tiene un rango de medida de 0-750mg/dl en suero y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 0.6% y 1.4% respectivamente.
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c): se determinó en suero mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el Autoanizador Menarini 8160, midiéndose en %, cuyo intervalo de referencia es de 4.0-5.5%. La técnica tiene unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 0.6% y 1% respectivamente.
- Calcio corregido : se determinó mediante la corrección de los niveles de calcio en suero con los niveles de proteína total en suero. El análisis se realizó en el Autoanizador ADVIA 2400 (Siemens) y se expresó en mg/dl, cuyo intervalo de referencia es de 8.5-10.5mg/dl.
- Fósforo: se determinó en suero mediante el análisis en Autoanizador ADVIA 2400 (Siemens), midiéndose en mg/dl, cuyo intervalo de referencia es 2.5-4.5mg/dl. La técnica tiene un rango de media de 0-20mg/dl en suero, una sensibilidad de 20ng/dl y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 0.8% y 1.5%, respectivamente.
- Factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-I): se determinó en suero mediante un inmunoensayo quimioluminiscente en el Analizador IMMULITE 2000 (Siemens) midiéndose en ng/ml, cuyo intervalo de referencia es 55-250ng/ml, para adultos mayores de 50 años. La técnica tiene una sensibilidad de 20ng/ml y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 3.6% y 6.9%, respectivamente.

- Vitamina D [25(OH)D³]: se determinó en suero mediante un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) en el equipo de inmunoensayo CP ADVIA Centaur (Siemens), midiéndose en ng/ml, cuyo intervalo de referencia es 10-70ng/ml. La técnica tiene un rango de medidas de 7-150 ng/ml y un coeficiente de variación (CV) interensayo del 20%. El rango de valores considerado de referencia, según la técnica analítica, fue de 10-70ng/ml, pero se consideraron 20 ng/dl como el umbral mínimo recomendado para una buena función ósea. El Servicio de Bioquímica del Hospital Virgen Macarena de Sevilla cuenta, desde hace cuatro años y renovado anualmente, con el certificado Proficiency del DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme).
- Hormona paratiroidea (PTH): se determinó la PTH intacta (PTH_i) en suero mediante un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) en el equipo de inmunoensayo CP ADVIA Centaur (Siemens), midiéndose en pg/ml, cuyo intervalo de referencia es 14-72pg/ml. La técnica tiene un rango de medidas de 2.5-1900 pg/ml y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 3.7% y 4.3%, respectivamente.
- Propéptido amino-terminal del colágeno tipo I (P1NP): se determinó en suero mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), en el autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens), midiéndose en ng/ml, cuyo intervalo de referencia es 16.27-73.87 ng/ml para mujeres postmenopausicas y de 15.20-71.80 ng/ml para hombres entre 51 y 70 años. La técnica tiene un rango de medidas de 5-1200 ng/ml, y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 1.9% y 2.9%, respectivamente.
- Telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I (β -CrossLaps): se determinó en suero mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), en el Autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens) midiéndose en ng/ml, cuyo valor de referencia es < 60 ng/ml para mujeres y < 70 ng/ml para hombres. La técnica tiene un rango de medidas de 0-5ng/ml, y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 2.1% y 3.3%, respectivamente.
- Fosfatasa alcalina total (FAT): se determinó en suero mediante el análisis en el Autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens), midiéndose

en UI/l, cuyo intervalo de referencia es 90-258 UI/l. La técnica tiene un rango de medidas de 0-1100 UI/l y unos coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo de 1.4% y 3%, respectivamente.

6. Determinaciones densitométricas

Se cuantificó la densidad mineral de cuello de fémur no fracturado y de columna lumbar (L2-L4) de los pacientes mediante densitometría dual de rayos X (Densitómetro HOLOGIC QDR-1000. Software Version 12.7.3:7), en la Unidad de Osteoporosis de la U.G.C. de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla). Se utilizaron para el presente estudio las siguientes variables:

- Densitometría de fémur, incluyendo:
 - Cuello de fémur: expresado en gha/cm² y T-Score, con un coeficiente de variación in vitro de 3,41% e in vivo de 2,90%.
 - Fémur total: expresado en gha/cm² y T-Score, con un coeficiente de variación in vitro de 0,97% e in vivo de 2,50%.
 - Densitometría de columna lumbar: valor medio de L1, L2, L3 y L4 expresado en gha/cm² y T-Score, con un coeficiente de variación in vitro de 0,53% e in vivo de 1,40%.

7. Cuantificación de células de estirpe osteoblástica en sangre periférica

7.1 Extracción de células mononucleares

Para la obtención de células mononucleares seguimos el protocolo de Böyum, 1986. Diluimos 10 ml de sangre total, obtenida por venipuntura al vacío en tubos heparinizados HD, con 10 ml de PBS (1:1). La sangre diluida se distribuye, con pipeta Pasteur, en tubos de fondo cónico sobre una solución de Ficoll-Hypaque 1:2. La solución debe añadirse cuidadosamente, deben quedar dos fases bien diferenciadas. Las muestras se centrifugan a 1250 x g (3000 rpm) durante 20 min, a 4°C. El anillo formado en la interfase contiene las células mononucleares (linfocitos y mononucleares), se recogen y se lavan con PBS a una centrifugación de 400 x g, durante 10 min a 4°C. Al precipitado resultante se le da un choque osmótico para lisar los glóbulos rojos: se resuspende el precipitado en 5 mL de H₂O destilada y desionizada durante 15-20 s, y rápidamente se le añade el mismo volumen, 5 mL, de NaCl al 1,8% para reestablecer la isoomolaridad. Volvemos a centrifugar a 400 x g, durante 10 min a 4°C.

Lavamos dos veces más con PBS (centrifugaciones a 400 x g, 10 min y 4°C). Resuspendemos las células en 100 µL y contamos las células con un hematocitómetro, y determinamos su viabilidad por exclusión al Tripán Blue.

7.2 Conteo celular

Tras la obtención del pellet, éste fue suspendido en un volumen conocido de DMEM y se realizó una dilución de 1:10 (180 µl de Trypan Blue + 20 µl de suspensión celular).

El conteo celular se realizó con la cámara de recuento Neubauer, bajo el microscopio óptico (Nikkon Eclipse TS100), que consta de dos cuadrículas idénticas, formadas cada una de ellas por 9 cuadrados. De estos, los cuatro que forman las esquinas de dicha cuadrícula, marcados como L (Figura 7.1), son los que se utilizan para el recuento.

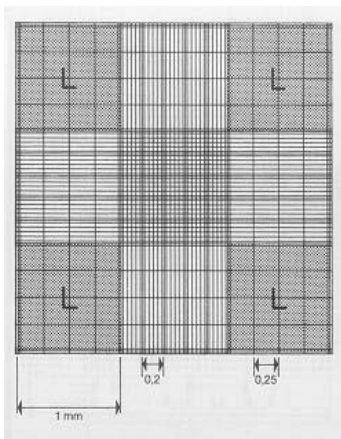


Figura 7.1. Cuadrícula de la cámara de Neubauer. Se realiza el recuento de las células que se distribuyan únicamente dentro de los cuatro cuadros L

Una vez realizado el recuento de células, se aplica la siguiente fórmula para obtener la concentración celular:

$$N^{\circ} \text{ células/ml} = X \times D \times 10^4$$

Donde:

- X: es la media del n° de células contadas en los 8 cuadros L
- D: es el factor de dilución de la muestra (en nuestro caso fue 10)
- 10^4 : es el factor de corrección de convertir 0,1 µl en 1ml.

Sólo fueron incluidas en el recuento las células viables, según el test de exclusión arriba mencionado.

7.3 Estudio de viabilidad celular

La viabilidad de las células se efectuó mediante el test de exclusión con Trypan Blue Stain 0,4% (BioWhittaker, Lonza. Verviers, Bélgica)

El *Trypan Blue* es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues, las células que aparecen claramente de color azul intenso son consideradas no viables, mientras que las que presentan un color refringente bajo el microscopio óptico, se las considera células viables o vivas.

8. Citometría de flujo

8.1 Inmunotinción

Para el análisis citométrico incubamos previamente las células con 10% de suero de asno (Jackson ImmunoResearch) y 10% IgG humana (FcR Bloking Reagent, Milteny Biotec, USA), para bloquear la unión a sitios no específicos, durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, 10^6 células se transfieren a tubos de 5mL de polistereno y son incubadas durante 60 min con el anticuerpo primario, anti-osteocalcina humana (R&D Systems,UK). Después de lavar un par de veces las células con PBS y centrifugaciones de 400 g 2 min a 4°C, para eliminar el anticuerpo libre, incubamos las células con el anticuerpo secundario GoatF(ab')₂ Fragment anti-Mouse IgG (H+L)-FITC (Beckman Coulter, USA) durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

A la vez, incubamos dos tubos, con la misma densidad celular, únicamente con el anticuerpo secundario como control isotópico, los cuales nos permitirán medir la tinción inespecífica. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. Tras la segunda incubación realizamos dos lavados más con PBS, centrifugando a 400 x g, 2 min a 4°C y mantuvimos las células en hielo hasta su inmediata análisis en el citómetro de flujo

8.2 Análisis citómetro de flujo

Las células en suspensión fueron analizadas en el citómetro XL-HLC (Beckam Coulter, USA) equipado con EL LÁSER DE ARGÓN de 488nm capaz de detectar light scatter (forward and side). Seleccionamos el canal de lectura correspondiente a la luz emitida. Para cada muestra se pasó

20000 eventos. La población positiva será identificada como células que expresen niveles específicos de la actividad fluorescente frente a la autofluorescencia no específica de los isotipos controles. Las células identificadas serán expresadas como porcentaje del “gate” seleccionado inicialmente correspondiente al área de los linfocitos- monocitos.

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22. Para el análisis descriptivo se han calculado el número de pacientes (N), los valores medios, desviación típica (D.T.), mínimo, máximo y percentiles 25, 50 y 75 P25, P50 y P75.

Para el análisis inferencial se ha tenido en cuenta un nivel de confianza del 95%, por lo que el p-valor experimental se ha comparado con un nivel de significación del 5%.

Para conocer el tipo de prueba más adecuada a emplear según sea el comportamiento de los datos se realizarán las siguientes pruebas:

Normalidad: Se aplica el test de Shapiro-Wilk ya que es el más apropiado para grupos con un tamaño muestral no demasiado elevado. El contraste de hipótesis que se plantea es:

H0: Los datos obtenidos se distribuyen según normalidad.

H1: Los datos obtenidos NO se distribuyen según normalidad

Aleatoriedad: Se aplica la prueba de rachas para una muestra y el contraste de hipótesis que se plantea es:

H0: La secuencia de valores obtenida en el grupo es aleatoria.

H1: La secuencia de valores obtenida en el grupo NO es aleatoria.

Homocedasticidad: Se aplica el test de Levene y contrasta si los grupos tienen la misma varianza.

Si se cumplen los criterios de normalidad y aleatoriedad se considera apropiado aplicar pruebas paramétricas. En este estudio se aplican las siguientes pruebas:

- ANOVA de un factor. Compara grupos independientes en los que los valores de la variable a estudiar cumplen los criterios paramétricos:
 - o Distribución normal

- Aleatoriedad en las respuestas.
- Homocedasticidad. Igualdad de varianzas.

- Prueba T para muestras independientes: Compara muestras independientes cuando los valores de las variables cumplen los criterios paramétricos.
- Prueba U de Mann-Whitney: Compara dos muestras independientes que no cumplen los criterios paramétricos.
- Prueba de Kruskal-Wallis: Compara más de dos muestras independientes que no cumplen los criterios paramétricos.

La relación entre las distintas variables se ha estudiado mediante el coeficiente de correlación bivariable de Pearson. En todos los casos se consideró alcanzada la significación estadística para valores de $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

En la tabla n° 1 se exponen las características antropométricas de las personas adultas estudiadas (diabéticos y controles), figurando el número total de varones y mujeres, con edad, peso, talla e índice de masa corporal. También aparece el tiempo de evolución de la enfermedad en el grupo de pacientes diabéticos. El grupo de diabéticos y controles eran semejantes en las características antropométricas señaladas, sin diferencia significativa alguna entre ambos grupos.

Adultos							
		Control			Diabéticos		
		N	%	Total	N	%	Total
Sexo	Hombre	13	48,1	27	8	44,4	18
	Mujer	14	51,9		10	55,6	

Adultos								
		Media	Desviación	Mínimo	Máximo	Percentiles		
			típica			25	50	75
Edad	Control	28,73	3,17	24	36	26,75	28,5	30,25
	Diabético	28,67	5,3	20	40	24,75	28,5	31,5
Peso	Control	70,67	11,15	49,9	90,8	62,6	69,6	78,5
	Diabético	73,17	12,5	51,7	97,3	63,8	74,8	82,35
Talla	Control	1,69	0,07	1,56	1,82	1,65	1,7	1,73
	Diabético	1,69	0,08	1,58	1,84	1,61	1,68	1,77
IMC1	Control	24,67	3,46	17,47	32,1	21,57	24,61	27,3
	Diabético	25,74	4,24	20,32	34,25	21,93	25,17	29,12
Tiempo Evolución Enfermedad	Diabético	6,32	3,78	1,5	13	3	5,5	9,38

Tabla 1: Características Antropométricas de las personas adultas estudiadas (Diabéticos y Controles).

En la tabla n° 2 se exponen las características antropométricas de los niños estudiados (diabéticos y controles), figurando el número total de niños y niñas, con edad, peso, talla e índice de masa corporal. También aparece el tiempo de evolución de la enfermedad en el grupo de pacientes diabéticos. Figura también en el caso de las niñas, el porcentaje de las mismas que ya habían tenido la menarquia. El grupo de diabéticos y controles eran semejantes en las características antropométricas señaladas, sin diferencia significativa alguna entre ambos grupos.

Niños							
		Control			Diabéticos		
		N	%	Total	N	%	Total
Sexo	Hombre	13	61,9	21	11	47,8	23
	Mujer	8	38,1		12	52,2	
Menarquia	No	11	100	11	18	85,7	21
	Si	0	0		3	14,3	

Niños								
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
Edad	Control	9,23	2,64	4	12,6	8,05	9,8	11,1
	Diabético	10,36	2,59	6,3	15,9	8,4	10,1	12
Peso	Control	36,94	14,65	17	61	21,55	37,5	46,63
	Diabético	37,63	13,37	19,5	67,5	26,8	39,5	41,2
Talla	Control	1,37	0,16	1,02	1,64	1,28	1,4	1,49
	Diabético	1,41	0,16	1,14	1,69	1,26	1,46	1,54
IMC1	Control	19,1	4,33	13,38	27,48	15,69	17,7	22,7
	Diabético	18,32	3,45	14	28,54	16,16	17,32	19,89
Tiempo Evolución Enfermedad	Diabético	3,49	3,32	0,2	11,8	0,8	2	5,8

Tabla 2: Características Antropométricas de los niños estudiados (Diabéticos y Controles).

En las tablas nº 3 y 4 están representados los valores densitométricos encontrados en columna lumbar (L2-L4), cuello femoral y cadera total. Adultos en tabla 3 y niños en tabla 4.

Adultos								
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
DMO cuello fémur	Control	0,89	0,15	0,61	1,28	0,77	0,88	0,98
	Diabético	0,87	0,1	0,7	1,13	0,81	0,85	0,92
DMO cadera total	Control	0,98	0,28	-0,1	1,46	0,91	0,99	1,13
	Diabético	0,93	0,23	0,1	1,23	0,92	0,95	1,02
T-score cuello	Control	0,05	1,22	-2,1	2,5	-0,8	-0,2	1
	Diabético	-0,11	0,74	-1,3	1,5	-0,75	0,05	0,43

T-score cadera total	Control	0,24	1,07	-1,8	2,8	-0,5	0,3	0,9
	Diabético	-0,01	0,62	-0,9	1,3	-0,38	-0,1	0,33
DMO columna (L2-L4)	Control	1,01	0,11	0,86	1,25	0,91	1	1,09
	Diabético	1,06	0,1	0,9	1,25	0,99	1,06	1,1
T-score columna	Control	-0,8	1,02	-2,4	1,2	-1,7	-0,7	0
	Diabético	-0,34	0,84	-1,6	1,6	-1	-0,4	0,06

Tabla 3: Valores densitométricos en adultos

		Niños						
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
DMO cuello fémur	Control	0,71	0,09	0,57	0,89	0,65	0,7	0,78
	Diabético	0,68	0,1	0,52	0,86	0,6	0,71	0,74
DMO cadera total	Control	0,82	0,08	0,72	0,99	0,75	0,79	0,88
	Diabético	0,77	0,1	0,6	0,95	0,69	0,78	0,84
Z-score cuello femoral	Control	0,16	1,04	-1,4	1,9	-	0,05	0,95
	Diabético	-0,32	0,78	-1,6	1,1	-0,9	-0,3	0,3
Z-score cadera total	Control	0,87	0,76	-0,2	2,5	0,4	0,65	1,38
	Diabético	0,25	0,88	-1,7	1,9	-	0,01	0,98
DMO columna (L2-L4)	Control	0,66	0,11	0,46	0,88	0,59	0,67	0,72
	Diabético	0,67	0,12	0,49	0,88	0,56	0,65	0,76
Z-score columna (L2-L4)	Control	0,2	1,05	-1,6	2	-	-	1,25
	Diabético	-0,17	0,96	-1,7	2	-1	-0,3	0,5

Tabla 4: Valores densitométricos en niños

En las tablas nº5 y 6 se exponen los parámetros bioquímicos más importantes estudiados (adultos en tabla 5 y niños en tabla 6).

		Adultos						
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
PTH	Control	42,7	20,18	13	106	32	35	51
	Diabético	34	13,33	21	77	23,75	32	38,5
P1NP	Control	42,77	14,9	20,72	77,5	29,97	40,03	55,73
	Diabético	43,56	16,89	23,64	89,69	28,29	43,28	51,19

Beta crosslap	Control	0,38	0,15	0,16	0,77	0,28	0,34	0,49
	Diabético	0,3	0,15	0,15	0,58	0,17	0,22	0,43
Ca	Control	9,46	0,46	8,5	10,6	9,2	9,5	9,8
	Diabético	9,34	0,37	8,7	10	9,08	9,35	9,63
P	Control	3,52	0,54	2,5	5,2	3,1	3,5	3,7
	Diabético	3,48	0,59	2,8	4,7	2,98	3,35	3,83
FA	Control	136,33	39,5	82	244	111	129	150
	Diabético	157,17	55,73	92	345	118,5	159,5	170,75
IGF1	Control	202,67	77,29	113	472	158	178	228,3
	Diabético	156,23	47,04	89	260	121,1	147	186,25
Glucosa	Control	83,7	9,36	65	97	76	86	90
	Diabético	217,83	75,89	95	413	163,25	221,5	243,75
Calcio corregido por proteínas	Control	9,53	0,4	8,5	10,7	9,3	9,5	9,8
	Diabético	9,58	0,25	9,2	10,2	9,4	9,55	9,8
Proteínas totales	Control	7,36	0,43	6,5	8,2	7,1	7,3	7,5
	Diabético	7,07	0,39	6,3	7,9	6,78	7,05	7,33
25(OH)D	Control	24,31	6,66	13,9	37,3	18,8	23,7	28,25
	Diabético	27,16	6,71	17,7	34,5	21,15	26,4	33,55

Tabla 5: Parámetros bioquímicos en adultos.

		Niños						
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
PTH	Control	30,08	11,18	14	49	20,25	30,5	38,25
	Diabético	29,76	11,53	12	53	21,5	28	39,5
P1NP	Control	488,75	140,02	237,5	733,6	390	481,7	626,8
	Diabético	578,63	286,13	76	1.200	425,55	496,4	813
Beta crosslap	Control	1,21	0,27	0,73	1,66	1,03	1,23	1,46
	Diabético	1,38	0,4	0,74	2,02	1,06	1,34	1,69
Ca	Control	9,77	0,36	8,9	10,3	9,6	9,8	10
	Diabético	9,57	0,35	9,1	10,3	9,3	9,5	9,8
P	Control	4,63	0,34	4	5,2	4,4	4,7	4,88
	Diabético	4,77	0,67	3,7	6,2	4,2	4,8	5,2
FA	Control	611,42	178,31	432	993	460,5	534,5	748
	Diabético	664,87	279,35	218	1.539	499	629	804
IGF1	Control	263,17	135,25	101	550	159,25	206	364,5
	Diabético	219,39	140,39	62	530	103,75	177,5	308

Glucosa	Control	85,08	5,99	74	94	80,75	85,5	88,75
	Diabético	190,87	81,53	95	356	117	170	262
Calcio corregido por proteínas	Control	9,82	0,36	9,1	10,4	9,53	9,9	10,1
	Diabético	9,88	0,35	9,4	10,6	9,63	9,9	10,08
Proteínas totales	Control	7,41	0,3	6,8	7,9	7,2	7,45	7,6
	Diabético	6,91	0,4	6,1	7,5	6,6	6,9	7,3
25(OH)D	Control	27,67	17,21	11,5	57,9	15,1	21,5	42,45
	Diabético	24,88	10,17	4,6	40,8	18,1	24,4	32,4

Tabla 6: Parámetros bioquímicos en niños.

En las tablas nº 7 y 8 se exponen (adultos y niños) los porcentajes de células circulantes de extirpe osteoblástica (OCN+) y los niveles de HbA1c encontrados en cada uno de los grupos estudiados.

		Adultos						
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
OSCFitc	Control	7,92	5,88	1,25	20,47	2,64	6,96	10,66
	Diabético	2,68	2,32	0,05	9,18	0,91	2,07	3,49
HbA1c	Control	5,25	0,31	4,5	5,7	5,1	5,3	5,43
	Diabético	7,98	0,86	6,4	10	7,38	8	8,33

Tabla 7: OCN+ y HbA1c en adultos

		Niños						
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
OSCFitc	Control	9,56	7,26	0,43	28,01	4,55	7,89	13,36
	Diabético	3,02	1,85	0,52	6,96	1,67	2,54	4,5
HbA1c	Control	5,57	0,21	5,1	5,8	5,5	5,6	5,7
	Diabético	8,17	1,41	6,1	11,4	7,1	7,8	9,1

Tabla 8: OCN+ y HbA1c en niños

Una vez conocida por las tablas anteriores la descripción de todos los parámetros estudiados en los distintos grupos, paso a exponer las diferencias encontradas entre controles y diabéticos (tanto en niños como en adultos) en los parámetros bioquímicos, densitométricos y especialmente en las células circulantes precursoras de osteoblastos, que constituyen el objetivo fundamental del siguiente trabajo.

En primer lugar haremos la comparación entre adultos controles y diabéticos; a continuación las diferencias encontradas en la edad infantil (controles vs diabéticos) y finalmente expondremos las diferencias encontradas en el grupo global de pacientes diabéticos (adultos + niños) en comparación a la totalidad de los sujetos controles.

En las Figuras 1 a 3 se exponen las diferencias significativas encontradas entre controles y diabéticos adultos. Se constata, como era de esperar, una diferencia significativa en los niveles de HbA1c y glucemia. Además, y es el punto fundamental de este trabajo, se constata que los pacientes diabéticos tienen una disminución significativa ($p < 0.001$) de células circulantes de estirpe osteoblástica (OCN+) en relación a los controles, con menos un tercio respecto a la media del grupo control (Figura 3)

Adultos	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,01	0,001

Adultos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	5,25	0,31	4,5	5,7	5,1	5,3	5,43
Diabético	7,98	0,86	6,4	10	7,38	8	8,33

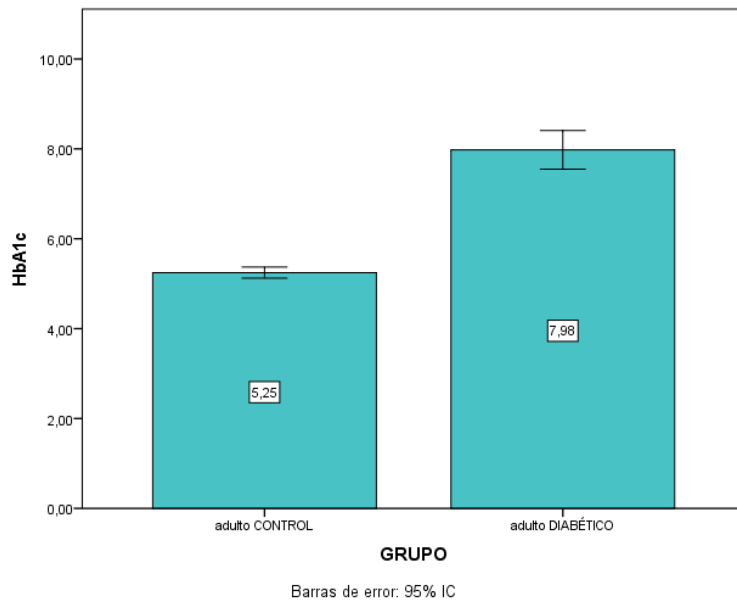


Figura 1: HbA1c en adultos (Control y Diabéticos)

Adultos	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	<0,001

Adultos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	83,7	9,36	65	97	76	86	90
Diabético	217,83	75,89	95	413	163,25	221,5	243,75

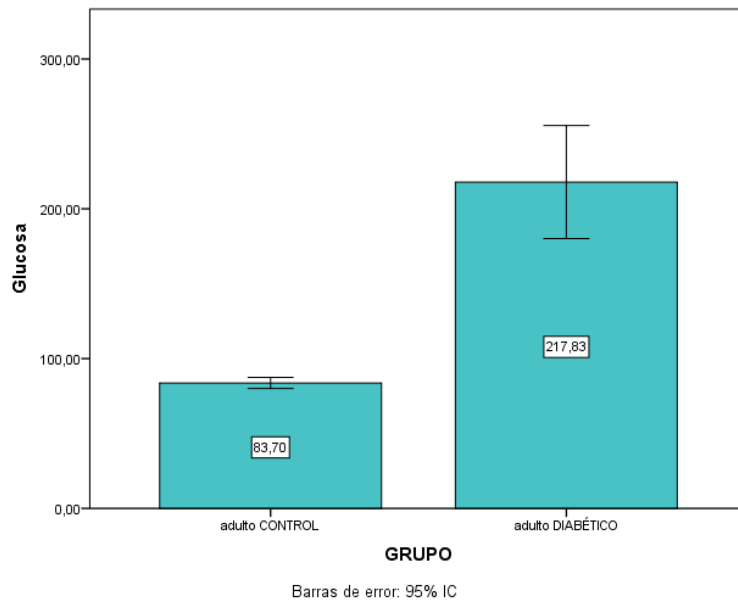


Figura 2: Glucemia en adultos (Control y Diabéticos)

Adultos
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

	Adultos						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	7,92	5,88	1,25	20,47	2,64	6,96	10,66
Diabético	2,68	2,32	0,05	9,18	0,91	2,07	3,49

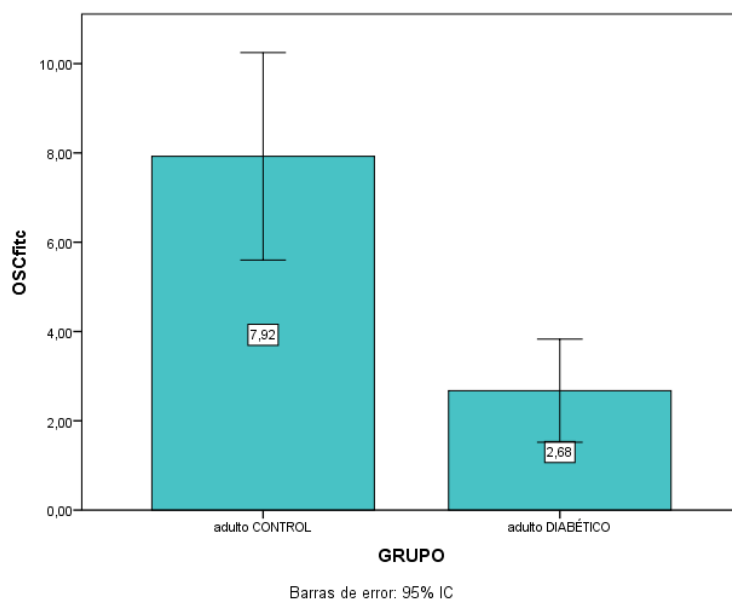


Figura 3: OCN+ en adultos (Control y Diabéticos)

Por otro lado se ha encontrado también en los pacientes adultos con DM 1, una disminución significativa de los niveles séricos de beta-crosslap e IGF-1 (Figura 4 y 5).

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros bioquímicos ni densitométricos estudiados.

Adultos
Prueba U de Mann-Whitney
0,041

Adultos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	0,38	0,15	0,16	0,77	0,28	0,34	0,49
Diabético	0,3	0,15	0,15	0,58	0,17	0,22	0,43

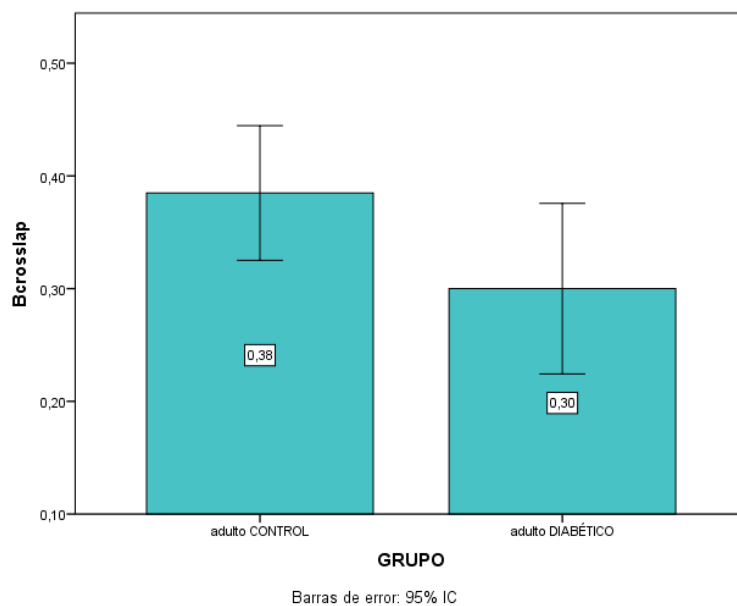


Figura 4: Beta-crosslap en adultos (Controles y Diabéticos)

Adultos
Prueba U de Mann-Whitney
0,022

Adultos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	0,38	0,15	0,16	0,77	0,28	0,34	0,49
Diabético	0,3	0,15	0,15	0,58	0,17	0,22	0,43

Control	202,67	77,29	113	472	158	178	228,3
Diabético	156,23	47,04	89	260	121,1	147	186,25

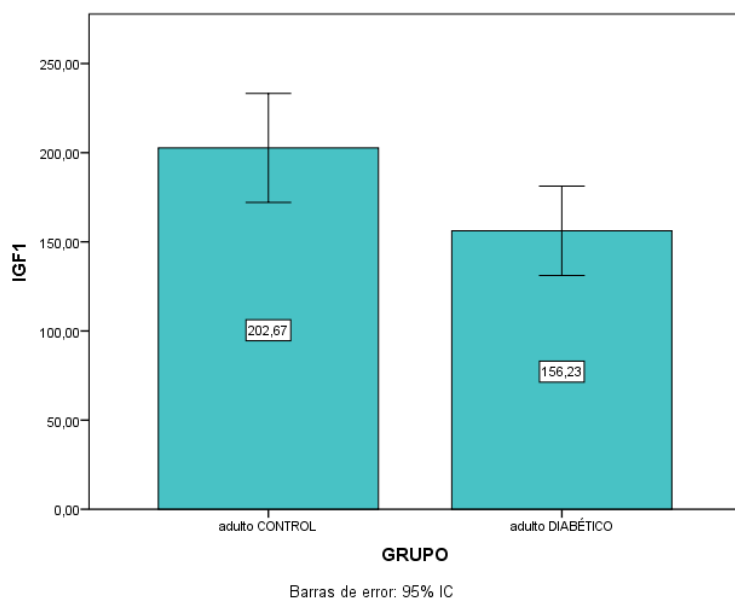


Figura 5: IGF 1 en adultos (Controles y Diabéticos)

En las figuras 6,7 y 8 se exponen las diferencias significativas encontradas entre controles y niños diabéticos. Se constata, como era de esperar, una diferencia significativa en los niveles de HbA1c y glucemia. Además, igual que sucedía en los diabéticos adultos, se constata que los niños diabéticos tienen una disminución significativa ($p < 0.001$) de células circulantes de estirpe osteoblástica (OCN+) en relación a los controles, con menos de un tercio respecto a la media del grupo control (figura 7).

Aunque en los adultos diabéticos no encontramos disminución de masa ósea respecto a los controles, en los niños diabéticos hemos encontrado una disminución significativa de la densidad mineral ósea (DMO) en cadera ($p = 0.047$). Esta disminución es de 0.81 desviaciones estándar de DMO menor en los niños diabéticos que en los controles (-0.81 z-score) (figura 8).

Niños
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

Niños							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	5,57	0,21	5,1	5,8	5,5	5,6	5,7

Diabético	8,17	1,41	6,1	11,4	7,1	7,8	9,1
------------------	------	------	-----	------	-----	-----	-----

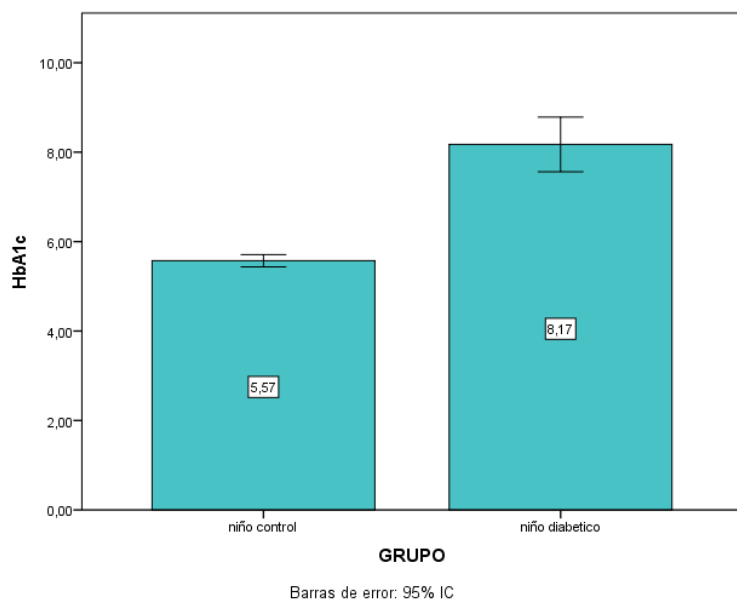


Figura 6: HbA1c en niños (Controles y Diabéticos)

Niños
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

Niños							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	9,56	7,26	0,43	28,01	4,55	7,89	13,36
Diabético	3,02	1,85	0,52	6,96	1,67	2,54	4,5

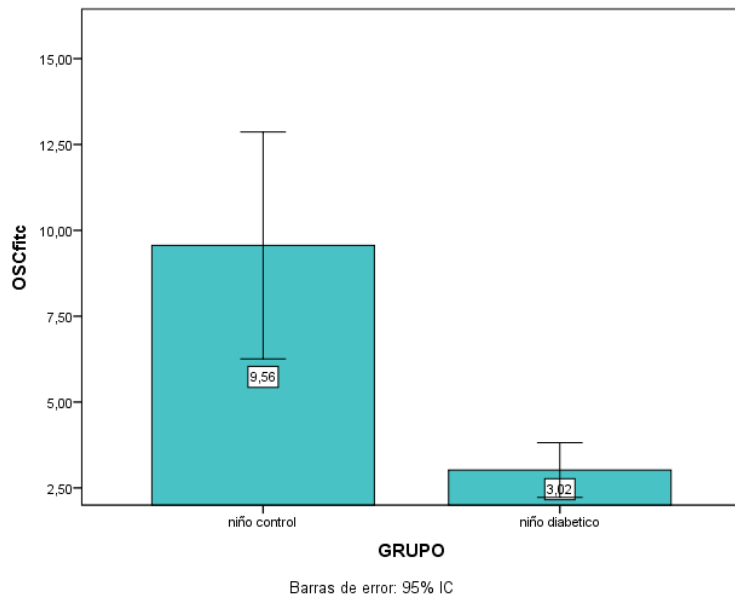


Figura 7: OSCfitc en niños (Controles y Diabéticos)

Niños	
Prueba T	Prueba de Levene
0,047	0,378

Niños							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	0,87	0,76	-0,2	2,5	0,4	0,65	1,38
Diabético	0,25	0,88	-1,7	1,9	-0,43	0,01	0,98

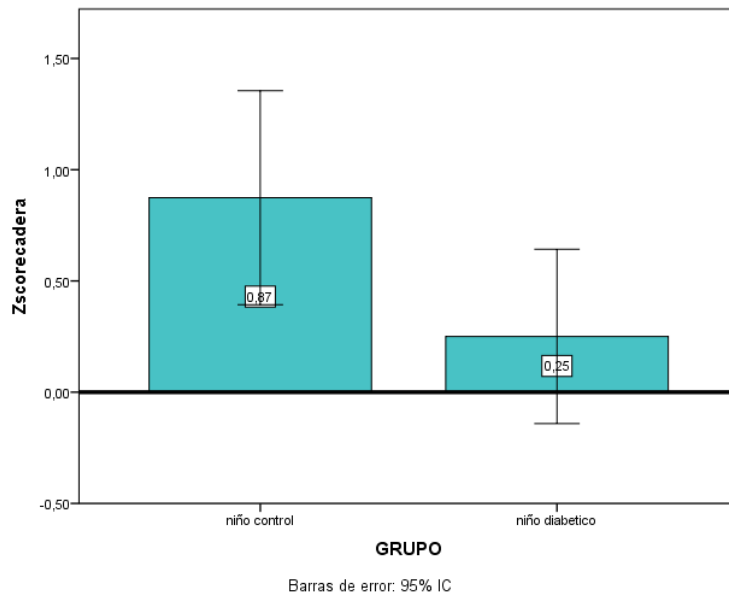


Figura 8: Z score cadera total en niños (Controles y Diabéticos)

Cuando comparamos el conjunto de pacientes diabéticos (adultos + niños) con la totalidad de los controles, objetivamos que se mantiene una disminución significativa del número de células periféricas (OCN +) en los diabéticos. Observamos también que los pacientes diabéticos además de una elevación de los niveles de glucemia y HbA1c, tienen incrementos significativos en los niveles séricos de P1NP, FA y disminución de IGF-1 y PTH (Figuras 9 a 15).

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

	Grupos diabéticos						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	8,64	6,5	0,43	28,01	3,64	7,12	10,69
DM	2,87	2,05	0,05	9,18	1,63	2,52	3,8

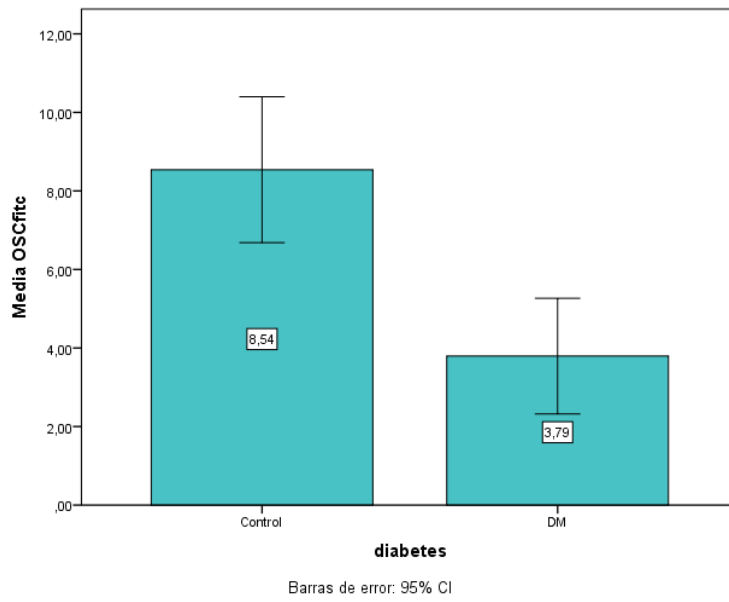


Figura 9: OSCfitc en DM y controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	5,34	0,32	4,5	5,8	5,2	5,4	5,6
DM	8,09	1,19	6,1	11,4	23	30	39

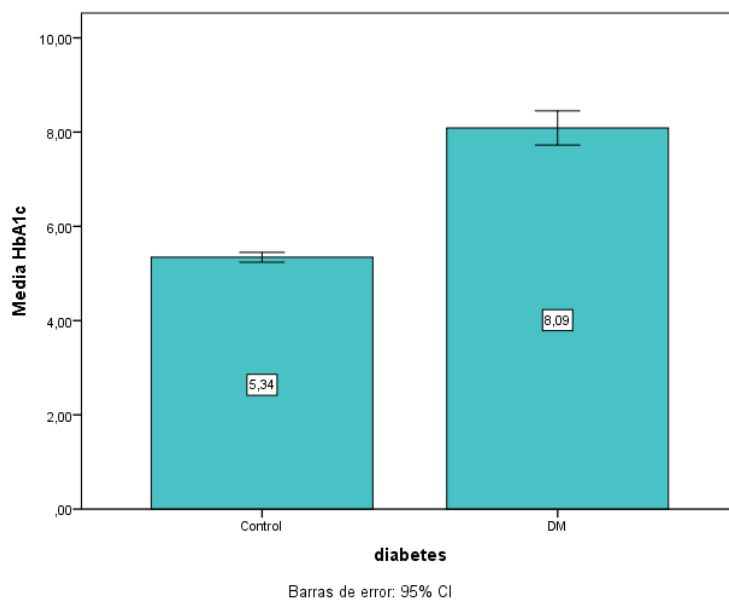


Figura 10: HbA1c en DM y controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
0,04

	Grupos diabéticos						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	38,82	18,7	13	106	29	35	49
DM	31,72	12,41	12	77	23	30	39

Figura 11: PTH en DM y controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
0,043

	Grupos diabéticos						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	171,87	217,88	20,72	733,6	35	52,52	353,18
DM	331,67	340,94	23,64	1.200	45,97	173,8	500,3

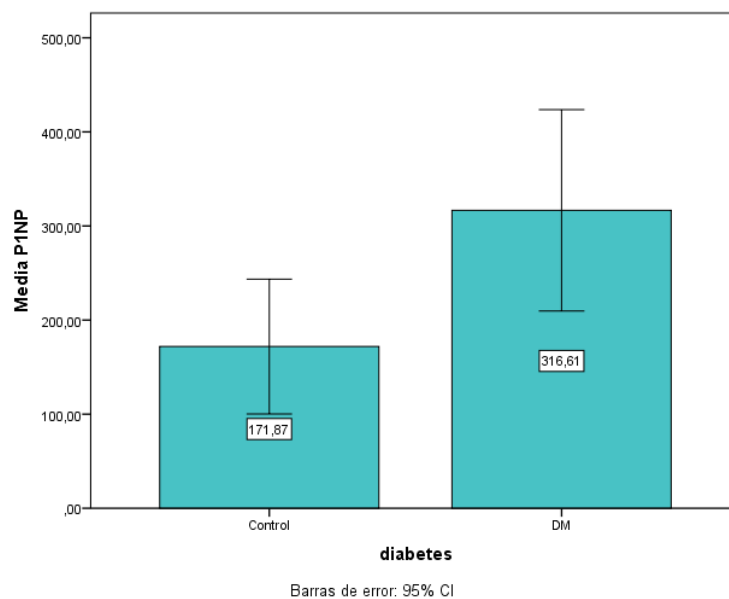


Figura 12: P1NP en DM y controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
0,007

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	282,51	244,16	82	993	119	145	458
DM	441,98	330,62	92	1.539	161	412	654,5

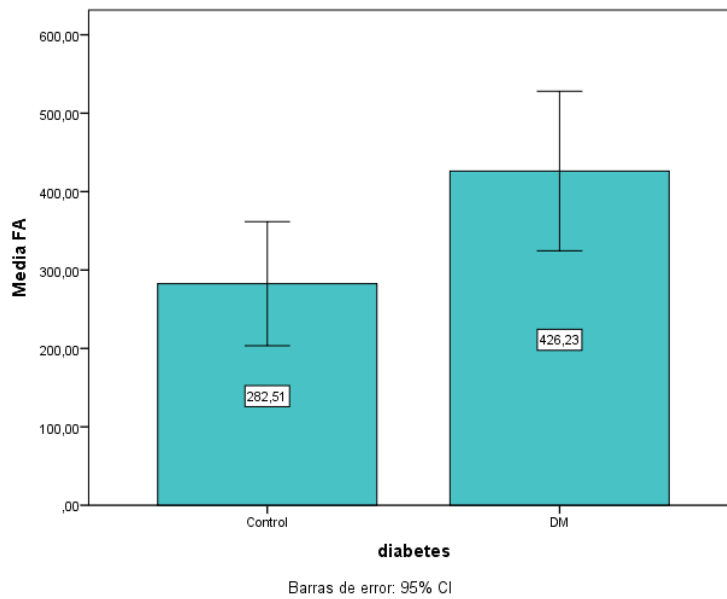


Figura 13: FA en DM y Controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
0,042

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	221,29	100,91	101	550	158	191	263
DM	189,66	110,38	62	530	117,55	150,5	233

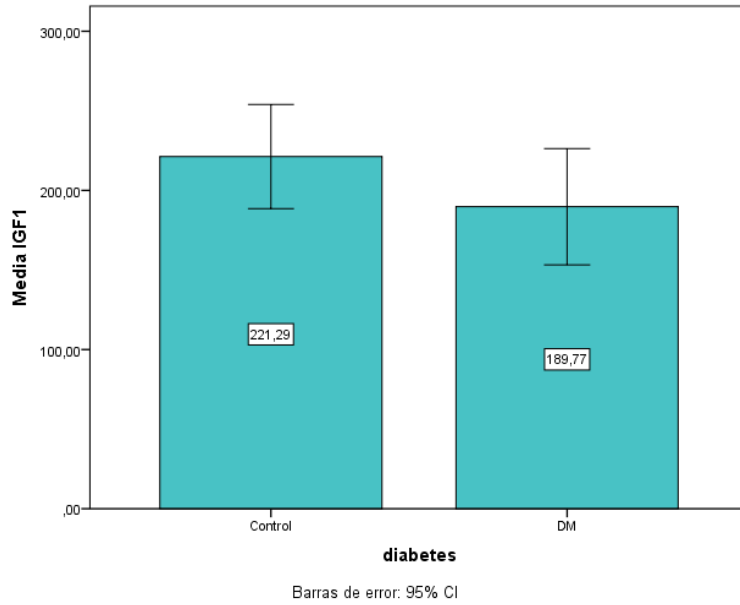


Figura 14: IGF1 en DM y Controles

Diabetes – No diabetes
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

	Grupos diabéticos						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Control	84,13	8,41	65	97	79	86	89
DM	202,71	79,29	95	413	129	208	244

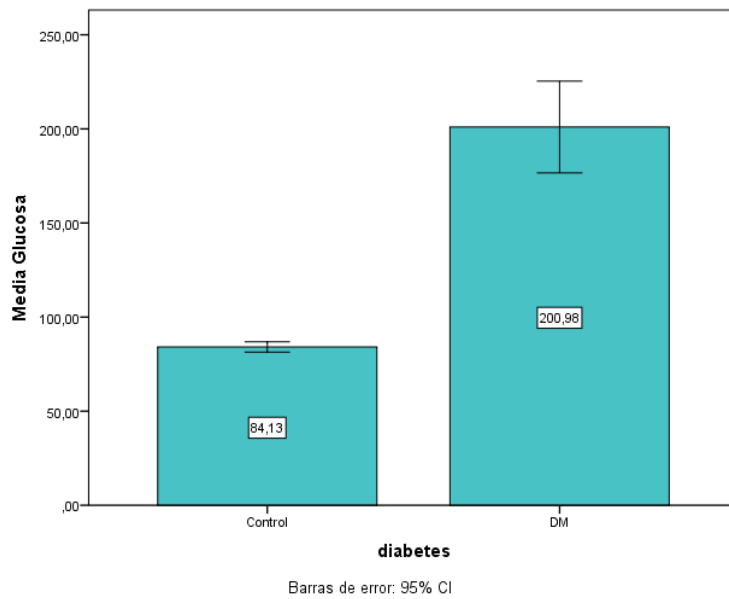


Figura 15: Glucosa en DM y Controles

Al comparar entre sí ambos grupos de pacientes diabéticos (adultos con niños), se observa que los niños en edad de crecimiento, presentan, como era de esperar, aumento significativo de los niveles séricos de P1NP, FA, beta-crosslap y fósforo, sin que exista diferencias significativas en el porcentaje de células circulantes OCN+ entre ambos grupos de pacientes (Figuras 16 a 20).

Grupos diabéticos	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	<0,001

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	43,56	16,89	23,64	89,69	28,29	43,28	51,19
Niño	578,63	286,13	76	1.200	425,55	496,4	813

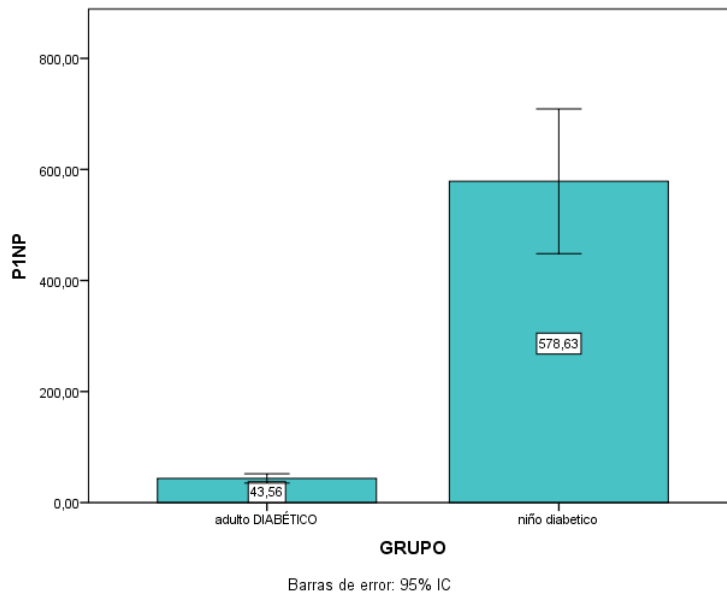


Figura 16: P1NP en diabéticos

Grupos diabéticos	
Prueba U de Mann-Whitney	
<0,001	

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	157,17	55,73	92	345	118,5	159,5	170,75
Niño	664,87	279,35	218	1.539	499	629	804

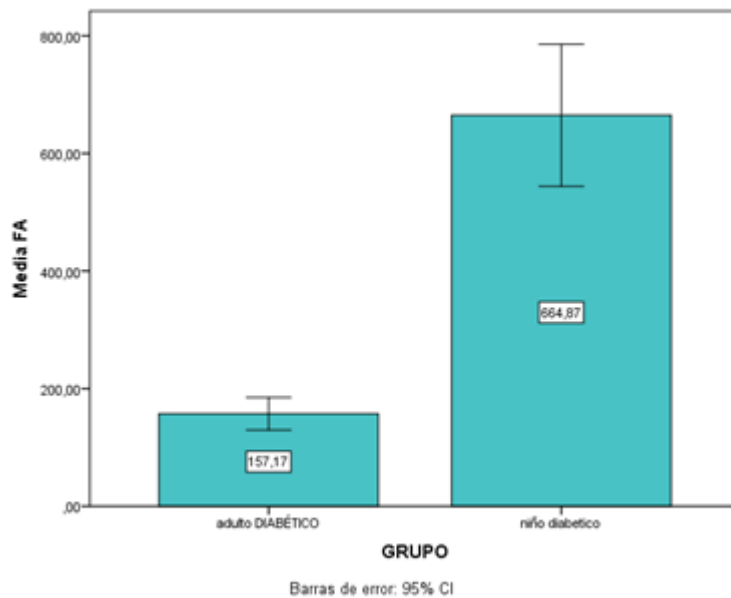


Figura 17: FA en diabéticos

Grupos diabéticos	
Prueba U de Mann-Whitney	
<0,001	

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	0,3	0,15	0,15	0,58	0,17	0,22	0,43
Niño	1,38	0,4	0,74	2,02	1,06	1,34	1,69

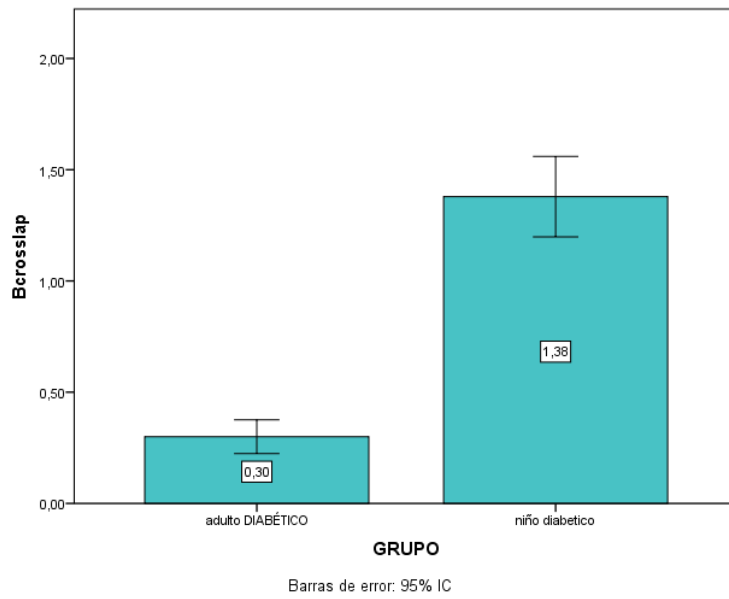


Figura 18: Beta-crosslap en diabéticos

Grupos diabéticos	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	0,472

Grupos diabéticos							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	3,48	0,59	2,8	4,7	2,98	3,35	3,83
Niño	4,77	0,67	3,7	6,2	4,2	4,8	5,2

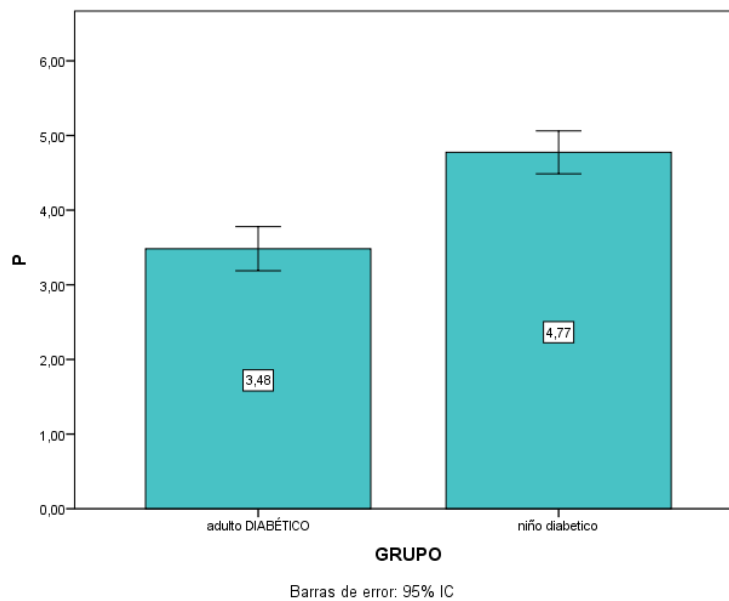


Figura 19: Fósforo sérico en diabéticos

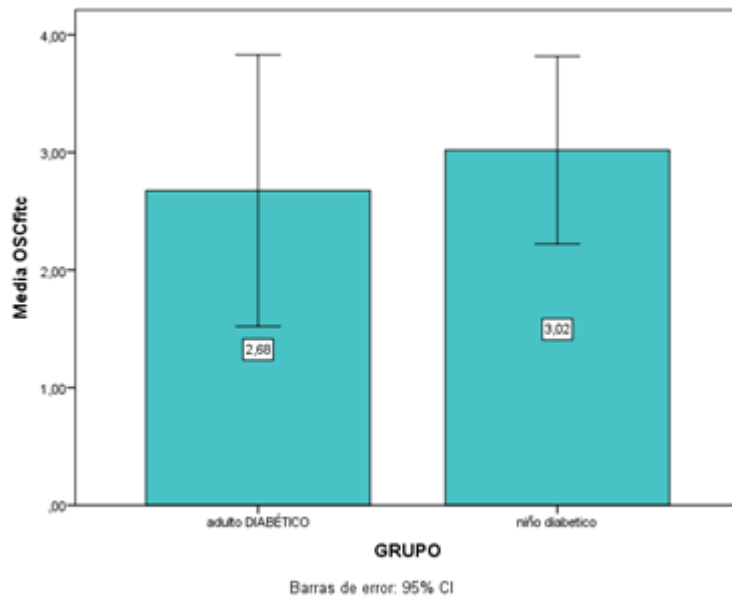


Figura 20: Porcentaje células OCN+ en diabéticos.

Al comparar ambos grupos de sujetos controles (adultos y niños), encontramos un aumento de células OCN+ en el grupo infantil sin alcanzar significación estadística. Por otro lado, como era de esperar, existe un aumento de IMC, DMO columna y cadera y PTH en los adultos, mientras que existe aumento de FA, P1NP, beta-crosslap y fósforo en los niños. No existen diferencias en los niveles de calcio sérico. Merece resaltar el aumento significativo de los niveles séricos de HbA1c en los niños por la mayor dificultad del control de los pacientes diabéticos en esta franja de edad (Figuras 21 a 31).

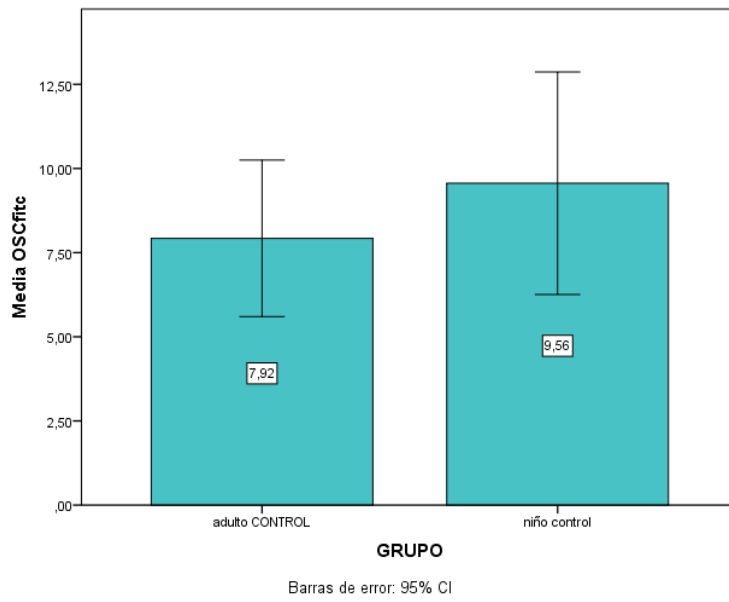


Figura 21: Células OCN+ en controles

Grupos control	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	0,124

	Grupos control						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	24,67	3,46	17,47	32,1	21,57	24,61	27,3
Niño	19,1	4,33	13,38	27,48	15,69	17,7	22,7

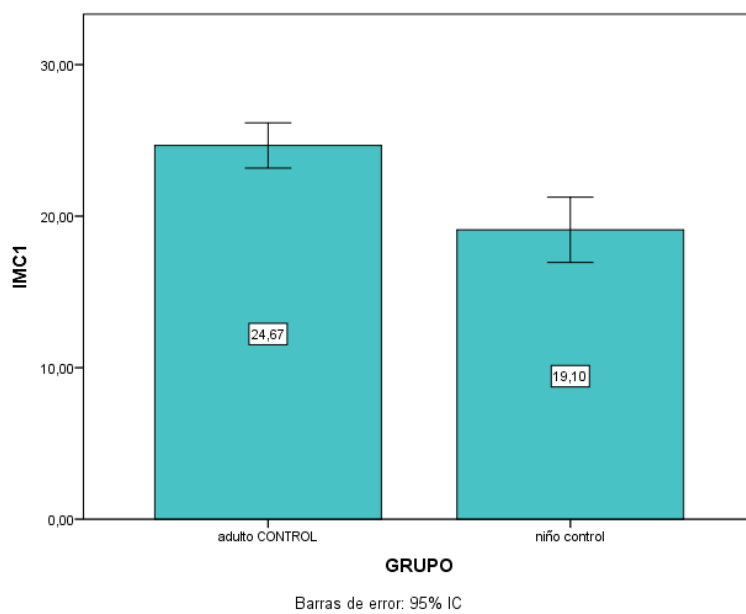


Figura 22: IMC en controles

Grupos control	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	0,407

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	1,01	0,11	0,86	1,25	0,91	1	1,09
Niño	0,66	0,11	0,46	0,88	0,59	0,67	0,72

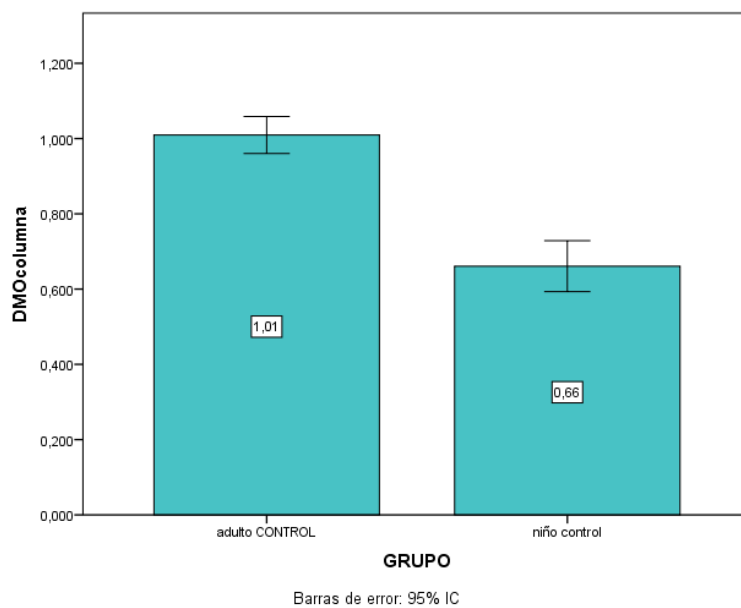


Figura 23: DMO columna (L2-L4)

Grupos control	
Prueba U de Mann-Whitney	
<0,001	

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	0,98	0,28	-0,1	1,46	0,91	0,99	1,13
Niño	0,82	0,08	0,72	0,99	0,75	0,79	0,88

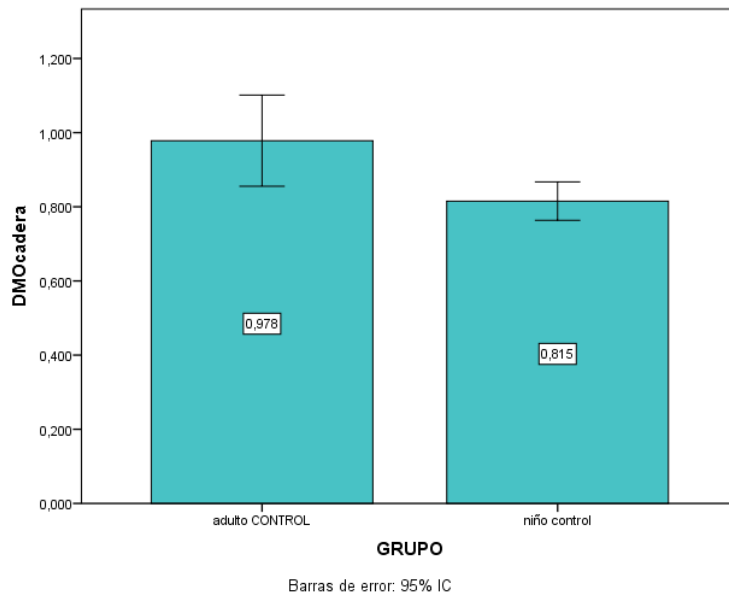


Figura 24: DMO cadera en controles

Grupos control	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	<0,01

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	42,77	14,9	20,72	77,5	29,97	40,03	55,73
Niño	488,75	140,02	237,5	733,6	390	481,7	626,8

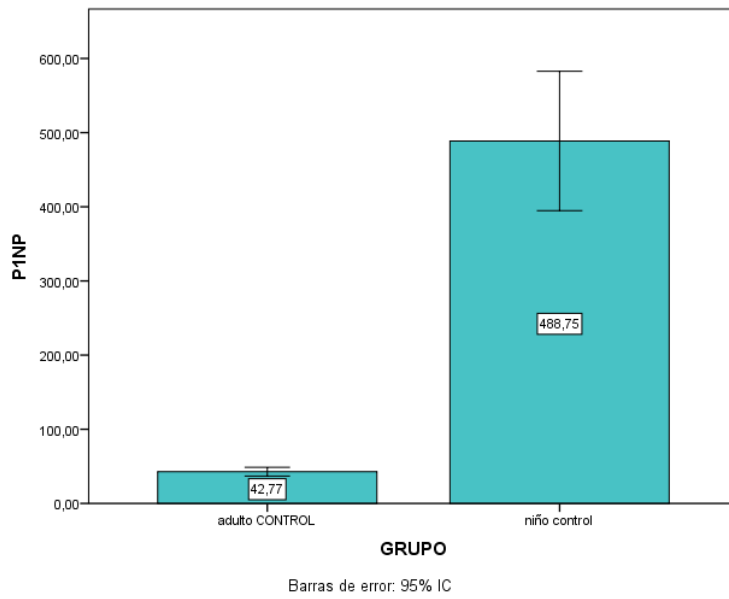


Figura 25: P1NP en controles

Grupos control	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	0,03

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	0,38	0,15	0,16	0,77	0,28	0,34	0,49
Niño	1,21	0,27	0,73	1,66	1,03	1,23	1,46

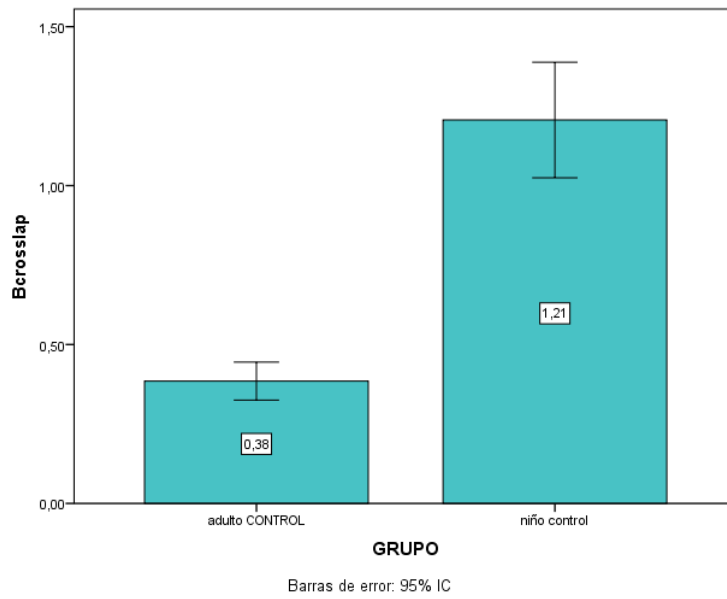


Figura 26: Beta-crosslap en controles

Grupos control	
Prueba T	Prueba de Levene
<0,001	0,339

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	3,52	0,54	2,5	5,2	3,1	3,5	3,7
Niño	4,63	0,34	4	5,2	4,4	4,7	4,88

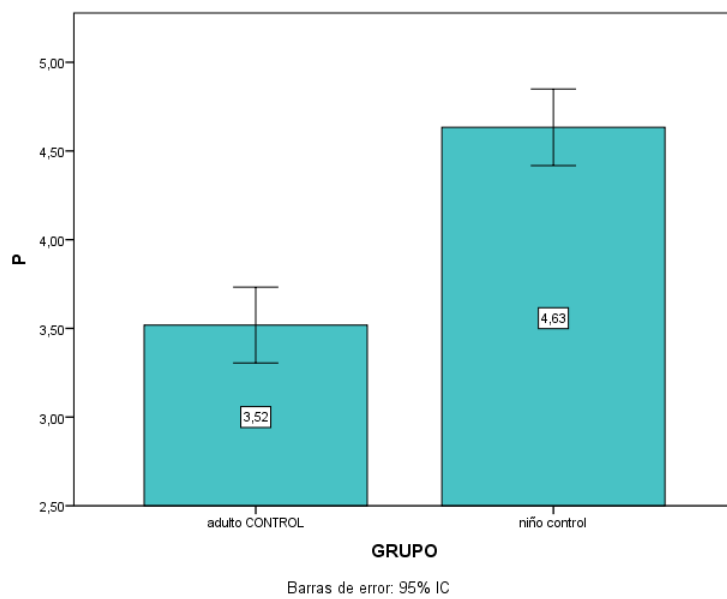


Figura 27: Fósforo sérico en controles

Grupos control
Prueba U de Mann-Whitney
0,001

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	5,25	0,31	4,5	5,7	5,1	5,3	5,43
Niño	5,57	0,21	5,1	5,8	5,5	5,6	5,7

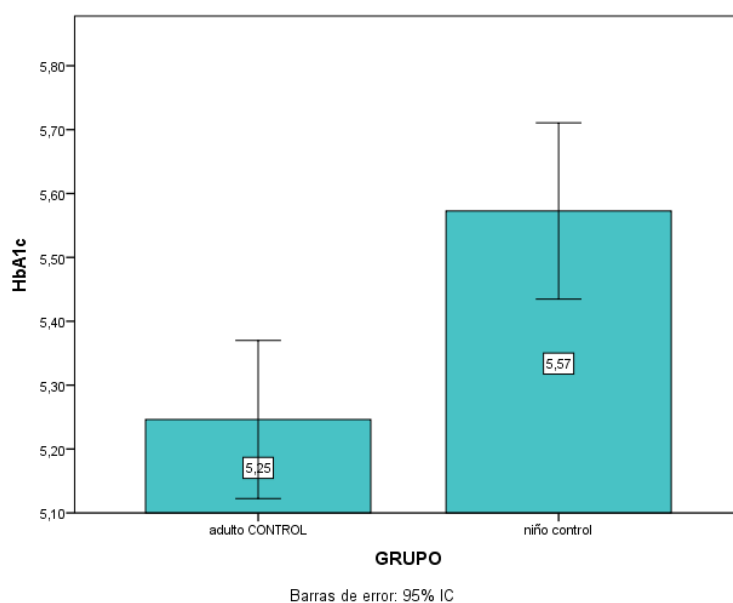


Figura 28: HbA1c en controles

Grupos control
Prueba U de Mann-Whitney
0,033

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	42,7	20,18	13	106	32	35	51
Niño	30,08	11,18	14	49	20,25	30,5	38,25

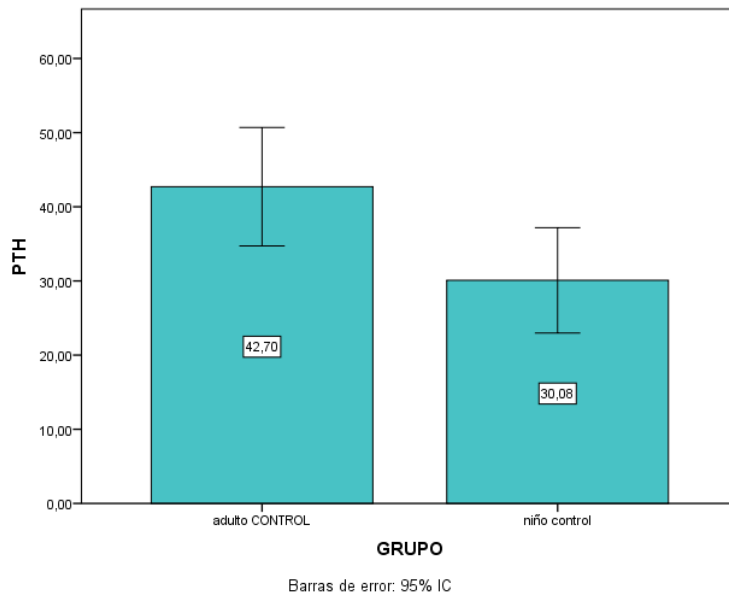


Figura 29: PTH en controles

Grupos control
Prueba U de Mann-Whitney
<0,001

	Grupos control						
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	136,33	39,5	82	244	111	129	150
Niño	611,42	178,31	432	993	460,5	534,5	748

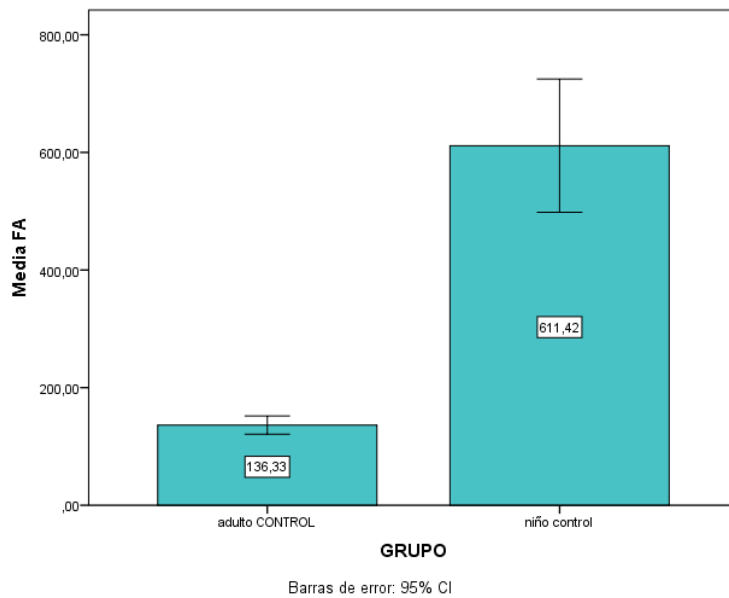


Figura 30: FA en controles

Grupos control
Prueba U de Mann-Whitney
0,018

Grupos control							
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Adulto	9,53	0,4	8,5	10,7	9,3	9,5	9,8
Niño	9,82	0,36	9,1	10,4	9,53	9,9	10,1

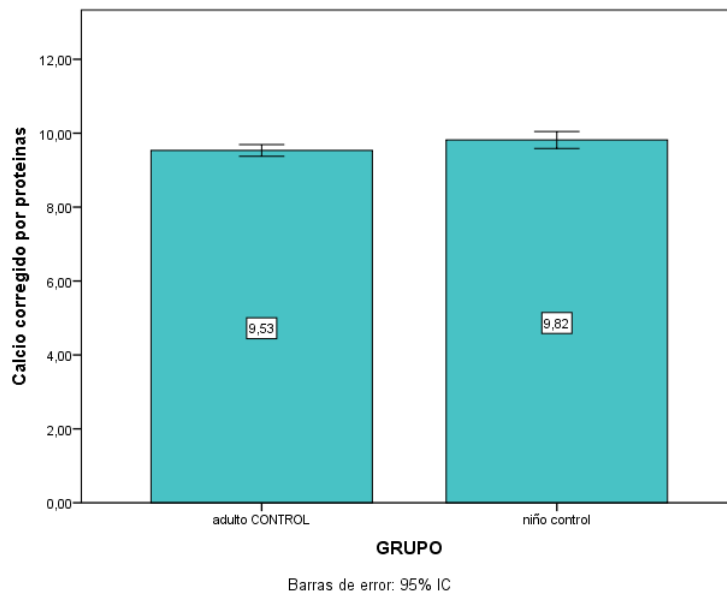


Figura 31: Calcio corregido por proteínas en controles

CORRELACIONES

Al considerar la población total estudiada (adultos y niños diabéticos y no diabéticos), existe una correlación lineal (Pearson) negativa entre el número de células de extirpe osteoblástica circulantes, representada como OSCfitc y los niveles de HbA1c ($r = - 0.484$; $p < 0.0001$) (Figura 32).

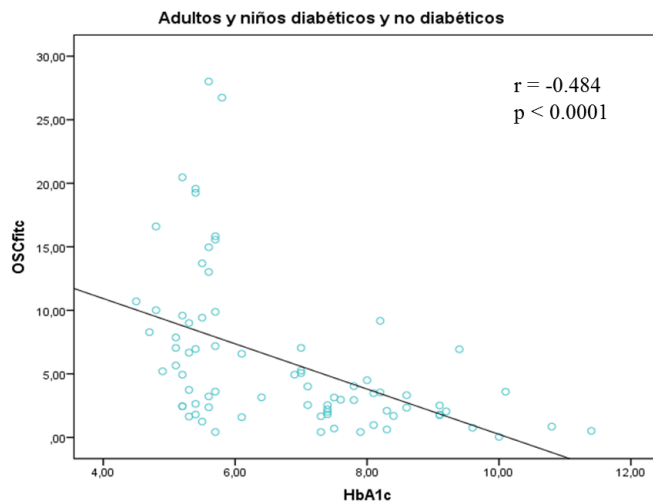


Figura 32: Correlación de OCN+ con HbA1c en el grupo total

Esta correlación negativa se mantiene tanto en el grupo de sujetos adultos ($r = -0.482$; $p < 0.001$), como en el grupo infantil ($r = -0.560$; $p < 0.001$)(Figuras 33-34).

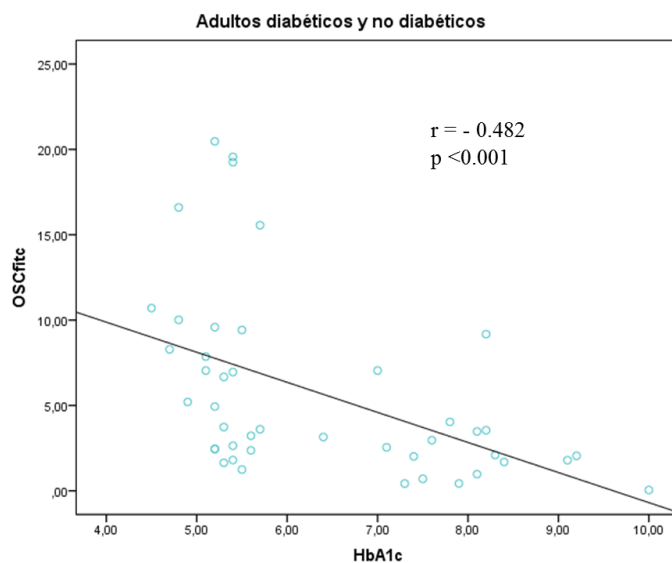


Figura 33: Correlación de OCN+ con HbA1c en adultos

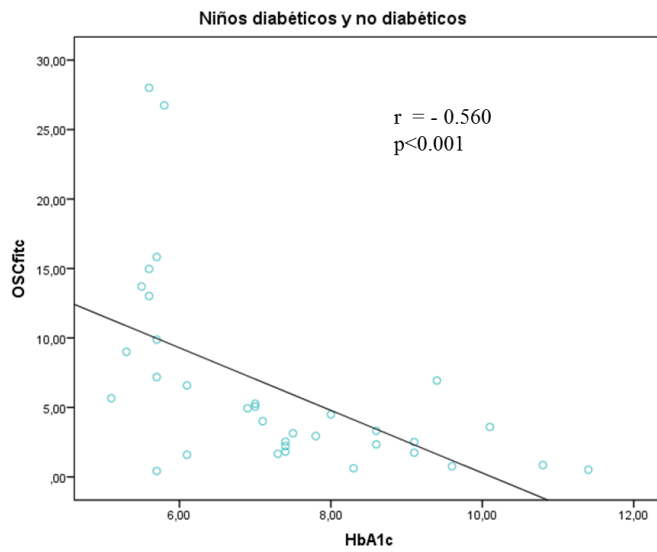


Figura 34: Correlación de OCN+ con HbA1c en niños

En los pacientes diabéticos que, como hemos mencionado previamente, tienen una disminución en el número de células OCN + circulantes, el número de estas células también presentan una correlación lineal negativa ($r = -0.318$; $p=0.04$), con los niveles de hemoglobina glicosilada (Figura 35).

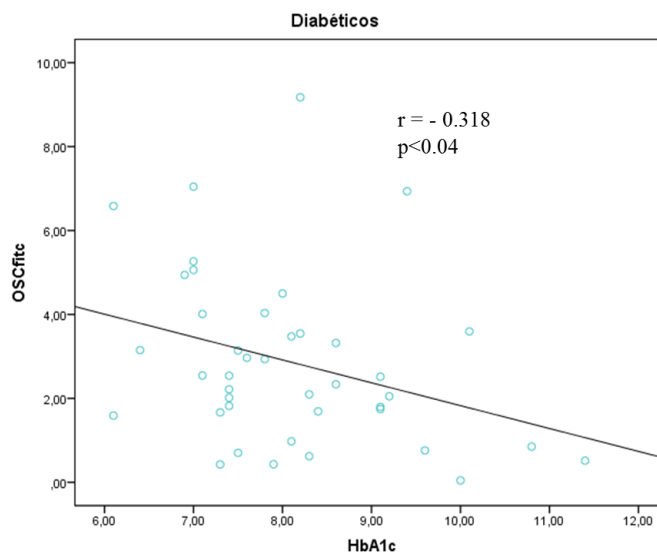


Figura 35: Correlación de OCN+ con HbA1c en adultos diabéticos

Valorando la posible relación existente entre el número de células circulantes OCN+ con los niveles de glucemia en ese momento, se ha encontrado que también existe una correlación lineal negativa entre ambos parámetros tanto en el grupo total ($r = -0.430$; $p < 0.0001$), como en el grupo de adultos ($r = -0.452$; $p < 0.002$) y de niños ($r = -0.423$; $p < 0.011$)(Figura 36-38).

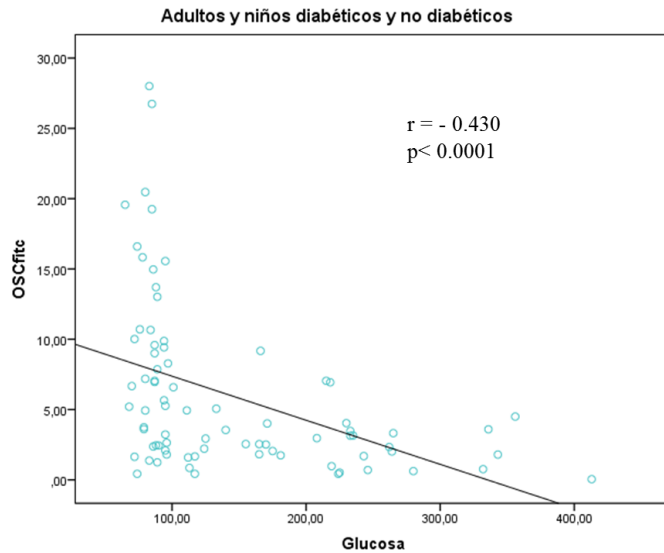


Figura 36: Correlación OCN+ y glucemia en grupo total

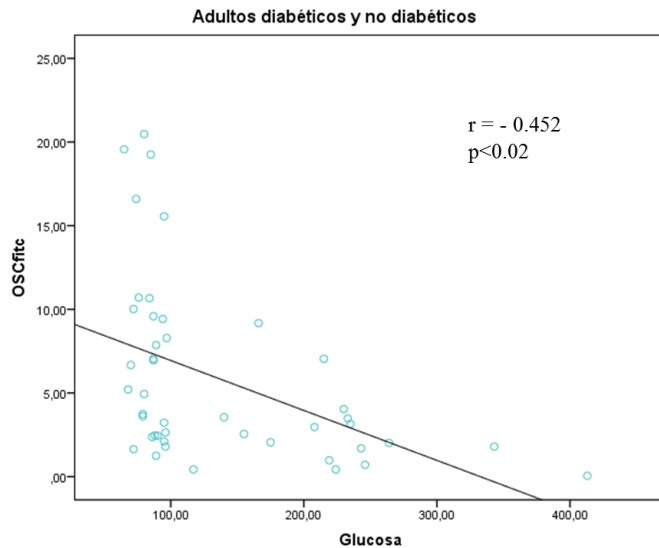


Figura 37: Correlación OCN+ y glucemia en adultos

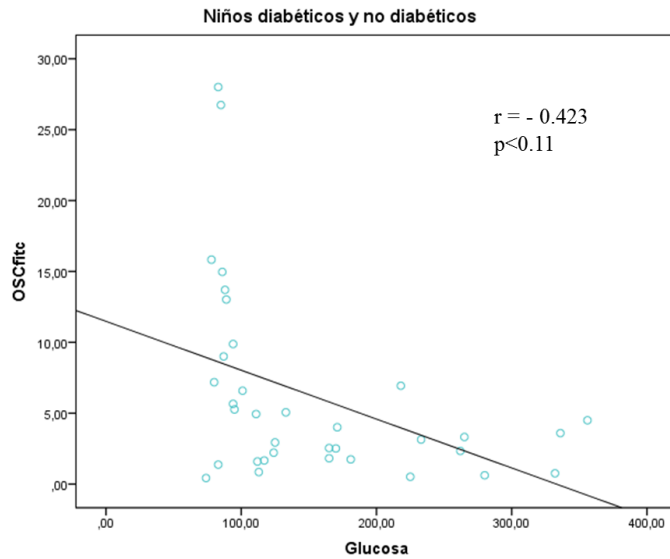


Figura 38: Correlación OCN+ y glucemia en niños

Al separar los pacientes diabéticos en infantiles y adultos, se pierde la correlación lineal entre hemoglobina glicada y células circulantes OCN+ que encontramos en la muestra global de diabéticos, lo que con toda seguridad se debe a la disminución del tamaño de la muestra en cada uno de los subgrupos.

También debe señalarse, lo que constituye un hallazgo importante, que el grupo de pacientes diabéticos infantiles, en el que hemos encontrado una disminución significativa de DMO en cadera, presenta una correlación negativa entre los niveles séricos de HbA1c y el Z score de cadera ($r = -0.542$; $p=0.009$) (Figura 39).

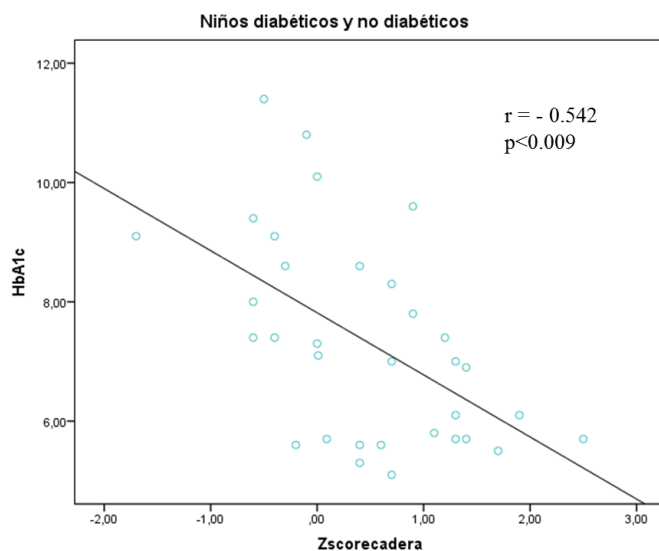


Figura 39: Correlación lineal negativa entre HbA1c y Z-score DMO cadera en niños

VI. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos hemos planteado el estudio de la cantidad de células de extirpe osteoblástica circulantes, caracterizadas por citometría de flujo por la presencia de OCN+, en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, tanto de edad adulta como en periodo infantil.

Hasta el momento actual, no existe publicación alguna que se haya interesado en este tema.

Aquí lo planteamos, teniendo en cuenta la ya conocida disminución de masa ósea y aumento de riesgo de fractura que padecen estos pacientes, con la hipótesis de que deben tener una disminución del número de células circulantes OCN+ ya que, al fin y a la postre, estas células contribuyen a la formación ósea acudiendo a los lugares más necesitados de restauración de hueso, como es conocido, por ejemplo, durante la formación del callo óseo posterior a las fracturas.

Los resultados que hemos encontrados, disminución del número de células OCN+ circulantes en pacientes con DM 1, avalan nuestra hipótesis. Se refuerza, además, por el hecho del hallazgo de una correlación negativa entre los niveles de estas células OCN+ y los niveles de glucemia, y especialmente por la existencia de una correlación negativa entre número de células OCN+ circulantes y niveles de hemoglobina glicosilada. Por tanto, objetivamos que la DM 1 tiene un efecto negativo sobre la aparición en la circulación de células de extirpe osteoblástica, necesarias para acudir donde el hueso las precise, y también que este déficit celular es mayor cuanto más descompensado está el proceso metabólico, puesto de manifiesto por la correlación negativa encontrada con los niveles de glucemia y de hemoglobina glicada.

Existe un trabajo reciente en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Manavalan JS y cols (364) estudian 18 pacientes con DM-2 y 27 controles, ambos grupos constituidos por mujeres con, al menos, 5 años de periodo postmenopáusico; fueron criterios de exclusión la historia de cetoacidosis, comienzo de la diabetes antes de los 25 años, IMC <20Kg/m² y el uso de insulina sin hipoglucemiantes orales. Tanto en los diabéticos como en los controles era criterio de exclusión la existencia de insuficiencia renal estadio III (FG < 60ml/min / 1.73m²) y cualquier otro proceso que pudiera afectar al metabolismo óseo. Caracterizan a las células periféricas de extirpe osteoblástica, igual que hacemos nosotros, por citometría de flujo y anticuerpos antiosteocalcina y encuentran una disminución de células osteocalcina + en sangre periférica en la DM 2 en relación a los

controles. Al mismo tiempo, objetivan una disminución de los parámetros histomorfométricos de formación ósea (superficie mineralizada, grado de formación ósea y superficie osteoblástica); también encuentran una expresión reducida del gen RUNX2 y expresión aumentada de marcadores de estrés oxidativo como SOD2.

Los pacientes con DM tipo 1 suelen tener mayor descompensación de su proceso metabólico, con niveles más altos de glucemia y mayores porcentajes de HbA1c, al tiempo que sus mitocondrias están expuestas a mayor estrés oxidativo. Por ello, y teniendo en cuenta la relación inversa encontrada entre células periféricas y estrés oxidativo, no es de extrañar nuestros hallazgos en la diabetes mellitus tipo 1, con mayor afectación incluso que en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Por otro lado, ya se ha comentado en la introducción la posible función de estas células circulantes de extirpe osteoblástica para acudir al lugar donde existe una fractura y contribuir a la recuperación y formación del callo óseo. Sin embargo, en nuestro experimento merece la pena resaltar dos hechos:

1. Hemos estudiado adultos jóvenes, con una edad media de 28 ± 5 años, edad muy distante a las mujeres con más de 5 años de menopausia y DM tipo 2, estudiadas por Manavalan JS y cols (364) .

Resalto este hecho porque, si bien en las mujeres postmenopáusicas pueden existir fracturas, o al menos microfracturas, que exijan la salida a circulación periférica de estas células para acudir al foco donde se ha producido la alteración anatómica, en nuestros pacientes jóvenes habría que buscar otro objetivo, ya que no resulta plausible que las células acudan a formar un callo donde no ha habido una fractura previa.

2. Encontramos que el número de células circulantes es aún mayor en niños durante el periodo de crecimiento, lo que ,lógicamente, debe estar en relación con la mayor formación ósea que ocurre en la infancia para mantener el modelado y un crecimiento óseo acelerado, función fundamental durante este periodo de la vida, al margen de la función ya expuesta de contribuir a la formación del callo de fractura. Todo lo hasta aquí expuesto nos lleva a concluir que las células circulantes OCN+ tienen, al menos, dos funciones importantes: por un lado, acudir al foco donde se ha producido una fractura o ¿ microfractura ?, a fin de contribuir a la generación de tejido óseo y formación de callo en el foco y en segundo lugar contribuir a la mayor formación ósea y especialmente al modelado y crecimiento óseo necesario durante la etapa de crecimiento y desarrollo.

Ello justifica que el porcentaje de estas células sea mayor durante la infancia que en adultos jóvenes que ya han completado su crecimiento y que este grupo, a su vez, tenga mayor número de este tipo celular circulante que las mujeres en periodo postmenopáusico.

El efecto tóxico e inhibitorio de la actividad osteoblástica que produce los niveles de hiperglucemia y el aumento de estrés oxidativo que existe en la diabetes mellitus, especialmente en la DM tipo 1, justifica que exista en estos pacientes una disminución importante y significativa de las células circulantes osteocalcina positivas, con mayor disminución en adultos jóvenes y especialmente en niños durante el periodo de mayor crecimiento, reforzado por el hecho de haber encontrado una correlación negativa entre el número de células y grado de descompensación diabética. Esta alteración debe contribuir, al menos en parte, a la conocida disminución de masa ósea y especialmente al aumento del riesgo de fracturas osteoporóticas en la DM tipo 1.

Todo lo anterior debe reforzar nuestra convicción de que con un buen tratamiento de la DM, no solamente estamos contribuyendo al retardo en la aparición de las complicaciones vasculares, sino que también resulta fundamental para mantener un desarrollo óseo correcto y armónico durante la infancia, así como para disminuir la aparición de fracturas osteoporóticas y sus secuelas en la edad adulta.

Los mecanismos íntimos que justifiquen esta alteración encontrada no están totalmente dilucidados. En efecto, aunque nuestros resultados demuestran una disminución de célula circulante OCN+ y en la DM exista disminución de masa ósea, el problema de hueso del diabético no es exclusivamente cuantitativo, ya que, como se ha resaltado previamente, el riesgo de fractura de estos pacientes es bastante mayor del que correspondería por su cantidad de masa ósea. Existe, por tanto, una alteración cualitativa del hueso que aumenta su fragilidad.

Sabemos que la acumulación de AGEs es un signo característico de los pacientes con DM y que algunas de sus complicaciones, tales como la neuropatía, retinopatía y nefropatía están relacionadas con la actividad biológica de los AGEs, especialmente AGE2 y AGE3 (371-373). Tanaka y cols (374), han comprobado como los AGEs también afectan al tejido óseo y han demostrado que la combinación de altas concentraciones de glucosa y AGE2 inhiben la mineralización de células osteoblásticas MC3T3-E1, aumentando la expresión de receptor de AGE (RAGE); además los AGE2 y AGE3 inhibían la diferenciación o mineralización de células ST2 (células estromales) de ratón, disminuyendo la expresión de Osterix y proteínas de

retículo endoplásmico, al tiempo que aumentaban la expresión de TGF- β (375-378). En un trabajo muy reciente del mismo grupo se estudia el efecto de altas concentraciones de glucosa y AGEs sobre la expresión de esclerostina y RANKL así como el grado de apoptosis producido en línea celular de osteocitos (células MLO-Y4-A2). El tratamiento de estas células con altas concentraciones de glucosa (22mM) y 100 μ g/ml de AGEs produce un aumento significativo de la expresión de esclerostina, y una disminución de la expresión de RANKL, junto a un aumento significativo de apoptosis.

Estos efectos negativos se antagonizan tratando previamente a las células con PTH-1-34, de lo que se infiere que el aumento de la concentración de glucosa y los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs) suprimen la formación ósea por aumento de la expresión de esclerostina en los osteocitos, mientras que los AGEs disminuyen la resorción ósea por la inhibición que se produce en la expresión de RANKL. Todo ello puede justificar, como señalan los autores (374) la disminución del remodelado óseo que existe en la diabetes mellitus.

Ehnert S y cols (379) realizan cultivos de células madres mesenquimales provenientes de médula ósea humana inmortalizadas (células SCP-1). Ellos inducen la diferenciación osteogénica añadiendo al medio habitual de cultivo suero de sujetos sanos al 5% o suero de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a la misma concentración. La proliferación celular se incrementó significativamente al tiempo que disminuyó la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización de la matriz ósea en las células tratadas con suero de diabetes mellitus tipo 2. La expresión de los niveles de genes y factores de transcripción osteogénicos estaban francamente alterados, existiendo en el grupo de suero diabético una clara disminución de la expresión de RUNX2 y SP-7, con aumento de STAT1 y TGF- β . En definitiva, encuentran que las células SCP-1 diferenciadas en presencia de suero de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen una función osteoblástica reducida, demostrando que el suero de estos pacientes tienen factores circulantes que afectan negativamente a la función ósea, planteando los autores que pudiese ser el TGF- β el factor causal de esta acción, debido al aumento que encuentran en el grupo al que añaden suero de pacientes con DM 2.

En un trabajo previo en nuestro laboratorio (380) se han realizado cultivos primarios de osteoblastos humanos obtenidos de explantes de hueso trabecular de cabeza de fémur de pacientes sometidos a prótesis de la misma por artrosis de cadera o fractura osteoporótica. Los explantes fueron incubados en los medios habituales y fueron sometidos a distintas

condiciones de cultivos durante 24 horas para valorar el efecto de distintas concentraciones de glucosa y AGEs sobre el funcionamiento de los osteoblastos. Los cultivos fueron sometidos a las siguientes condiciones:

- 4.5 mM Glu: DMEM con glucosa fisiológica (4.5mM D-Glu)
- 25 mM Glu: DMEM con concentración elevada de glucosa (25 mM D-Glu)
- 25 mM Glu + AGEs: DMEM con concentración elevada de glucosa (25mM D-Glu) suplementado con AGEs (2µg/ml)
- Man: DMEM con glucosa fisiológica (4.5mM D-Glu) suplementado con manitol (25mM) para descartar la influencia del efecto hiperosmótico de la concentración elevada de glucosa sobre los cultivos.

En todas las condiciones experimentales del cultivo se realizó estudio de viabilidad celular, extracción y determinación de la concentración de ARNt, transcripción inversa del ARNt y finalmente reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR real time) para el estudio de la expresión de genes, valorándose osteoprotegerina (OPG, ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), Runx2, Osterix (OSX), receptor de AGEs (AGER) y Gremlin (GREM1).

Se establecieron tres grupos de cultivos primarios de osteoblastos humanos según la enfermedad de base de los pacientes:

- 10 pacientes con oteoartritis
- 10 pacientes con fracturas osteoporóticas
- 12 pacientes con fracturas osteoporóticas y DM tipo 2

En este trabajo se objetivó que la proliferación de los cultivos de hOB procedentes de pacientes con OP+DM2 fue la más lenta, siendo el tiempo necesario para llegar a la primera confluencia de 32 ± 10 días. También fue más alargado el tiempo hasta la segunda confluencia en los pacientes diabéticos; demostrándose por tanto el efecto negativo de la DM sobre la proliferación osteoblástica.

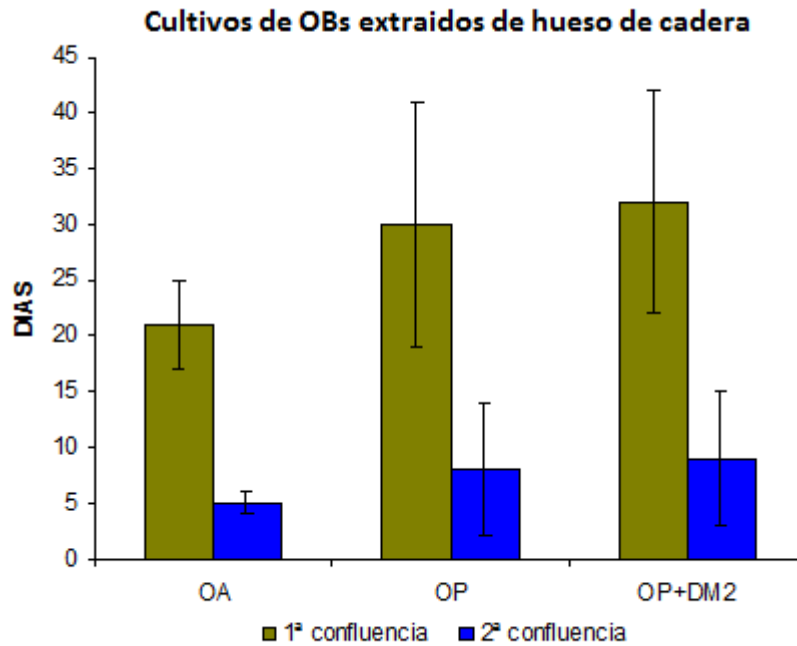


Figura 6.1. Cultivo primario de osteoblastos extraídos de hueso de cadera. Tiempos hasta alcanzar primera y segunda confluencia. (380)

Al analizar la expresión de los distintos genes en los cultivos sometidos a las distintas condiciones experimentales antes señalada, se observó que las altas concentraciones de glucosa y la presencia de AGEs en los cultivos disminuyen la expresión de Runx2 y OSX, al tiempo que disminuye también la relación RANKL/OPG. Todo ello implica el efecto deletéreo de las alteraciones metabólicas propias de la diabetes (hiperglucemia y aumento de AGEs) sobre las células osteoformadoras. La disminución del cociente RANKL/OPG puesta aquí de manifiesto en condiciones experimentales puede favorecer la disminución del remodelado óseo que se observa “in vivo” en los pacientes diabéticos.

También se observó que los cultivos de hOB procedentes de pacientes diabéticos tienden a una mayor expresión génica de AGER, en presencia de un medio hipergluémico con AGEs, lo que significa una mayor sensibilidad de las células osteoblásticas a las altas concentraciones de glucosa y AGEs, con mayor sensibilidad para el efecto funcional negativo que esas alteraciones producen en los osteoblastos.

De los trabajos expuestos anteriormente se deduce que las altas concentraciones séricas de glucosa que mantiene el diabético junto a los elevados niveles de AGEs, resultan claramente perjudiciales para el hueso, con disminución clara del número de células osteoblásticas en sangre

periférica, junto a una disminución de formación de osteoblastos en la superficie de remodelado óseo, a lo que contribuye el aumento de producción de esclerostina por los osteocitos. Queda claro que el déficit y/o resistencia a la insulina, está en la base del trastorno metabólico óseo.

Por otro lado, resulta interesante señalar que las mismas alteraciones metabólicas que producen las anomalías óseas (hiperglucemia, aumento de hemoglobina glicada y AGEs), están en la base del riesgo cardiovascular de los pacientes diabéticos. Se conoce que la calcificación vascular es un signo importante de la arteriopatía diabética y las microcalcificaciones de la íntima podría contribuir a la desestabilización de las placas de ateroma. Se sabe, además, que incluso en estadios precoces de la alteración metabólica (prediabetes) ya existe un mayor riesgo de complicaciones micro y macrovasculares (381) y existen estudios que demuestran que hay una asociación entre niveles de HbA1c y cantidad de calcio en arterias coronarias incluso en personas no diabéticas (382).

La calcificación vascular es un proceso activo que puede estar mediado, al menos en parte, por células circulantes que recorren el eje hueso-vaso sanguíneo. Eghbali-Fatourehchi et al, (342) al describir por vez primera la existencia de células de exirpe osteoblástica en sangre periférica ya sugirieron que éstas podrían contribuir a la calcificación vascular ectópica. Fadini GP y cols, (383) han demostrado que existen células circulantes que expresan al mismo tiempo marcadores osteogénicos (osteocalcina o fosfatasa alcalina) y marcadores de células progenitoras endoteliales (EPCs). Estas células se reconocen por los marcadores de superficie CD 34, CD 33 y KDR, existiendo distintos tipos, como CD 34+/KDR + o CD34+/CD133+/KDR+. La fracción CD133+/CD34-/KDR- se ha descrito como compuesta por células muy activas desde un punto de vista funcional, que acuden al lugar donde se desarrolla una isquemia. De hecho, estas células se han encontrado en un número elevado en pacientes con lesiones coronarias inestables, promoviendo la reendotelización y reducción del tamaño de la lesión después de una injuria vascular (384).

También se ha comprobado un porcentaje aumentado de células EPC osteocalcina+ en pacientes con aterosclerosis coronaria y su retención dentro de la propia circulación coronaria, lo que induce a pensar que pueden tener un papel en la calcificación vascular (385-386).

Además, las células CD 133+/CD 34-/KDR+ , que co-expresan osteocalcina, son un marcador independiente de lesiones inestables y pueden, incluso, predecir eventos futuros (387).

Flammer A J y cols (370), han estudiado las células periféricas con marcadores osteogénicos (osteocalcina +) y marcadores endoteliales (CD33+/CD34-/KDR+) en pacientes con nivel de HbA1c en rango prediabético (HbA1c >5.6%) comparándolo con sujetos normales. Encuentran que los pacientes prediabéticos tienen un aumento de células OCN+/CD133+/CD34-/KDR+, células de extirpe endotelial con capacidad osteogénica, lo que hace pensar que puedan tener un papel en el aumento de calcificación vascular en este estadio precoz de alteración del metabolismo de la glucosa, coincidiendo con los hallazgos previos encontrados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (388).

Resulta evidente, por tanto, la interconexión que existe entre metabolismo óseo, metabolismo glicídico y su relación con la aterosclerosis, de tal manera que la alteración primaria del metabolismo de la glucosa por déficit/resistencia a la insulina da lugar a trastornos importantes del metabolismo óseo y vascular, produciendo una disminución de la formación ósea con aumento del riesgo de fractura, al tiempo que disminuyen las células circulantes OCN+, lo que impide la regeneración ósea eficaz. Sin embargo, se induce un mayor número de células que tienen al mismo tiempo marcadores de osteoformación (OCN+) y marcadores de extirpe endotelial (CD33+/CD34-/KDR+), induciendo peor regeneración del endotelio, con mayor tendencia a la inestabilidad de las placas y calcificación vascular, pudiendo estar la alteración ya patente en estadio prediabético.

Prefundizar en el mejor conocimiento de los mecanismos íntimos de estas alteraciones debe ser objeto de las investigaciones a realizar durante los próximos años, lo que permitirá, sin duda, una mejor prevención y un tratamiento precoz más efectivo de procesos tan importantes y prevalentes como la osteoporosis, diabetes mellitus y enfermedad vascular.

VII. CONCLUSIONES

1. Células precursoras, de estirpe osteoblástica, (CPO), circulan en sangre periférica, donde pueden ser identificadas con marcadores específicos (OSC+) por citometría de flujo.
2. En las personas adultas, este tipo de células representan aproximadamente el 8 % de las células mononucleares circulantes.
3. Durante el periodo de crecimiento infantil, existe un aumento de estas células circulantes, llegando a ser un 20% mayor que las encontradas en los adultos.
4. En los pacientes con DM-1 también se identifican estas células (OCN+), existiendo una disminución significativa de las mismas.
5. Al dividir a los pacientes diabéticos en dos grupos independientes (adultos e infantiles) y compararlos con personas controles de edad semejante, se comprueba que en ambos grupos se mantiene la disminución significativa, siendo aproximadamente un tercio de las existentes en los controles no diabéticos.
6. El déficit de células OCN+ es más evidente cuanto mayor es el grado de descompensación de la diabetes, tanto en niños como en adultos, existiendo una correlación lineal inversa y significativa del porcentaje de células periféricas con los niveles séricos de glucemia basal y de HbA1c.
7. En la población infantil diabética existe una disminución significativa de masa ósea (DMO) en cadera, mayor cuanto más descompensada se encuentre su proceso metabólico, ya que existe una relación inversa y significativa entre Z-score de DMO de cadera y la HbA1c.
8. El déficit de células circulantes (OCN+) que hemos encontrado puede jugar un papel en la disminución de masa y alteración de la microarquitectura ósea del paciente con DM-1, así como en el aumento de riesgo de fractura y el retardo en la consolidación de las mismas que padecen estos enfermos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Standards of Medical Care in Diabetes 2014. *Diabetes Care* 2014; 37: S14-80
2. Zimmet P, Alberti, K.G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* (2001) 414, 782-787.
3. Danaei,G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* (2011) 378, 31-40
4. Shaw JE, Sicree R.A. & Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* (2010) 87, 4-14.
5. Chen L, Dianna JM, Zimmet PZ et al. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat. Rev. Endocrinol* (2012) 8, 228-236
6. Pinhas-Hamiel O. & Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J. Pediatr* (2005) 146, 693-700.
7. Williams, D.E. et al. Prevalence of impaired fasting glucose and its relationship with cardiovascular disease risk factors in US adolescents, 1999-2000. *Pediatrics* (2005) 116, 1122-1126.
8. Li,C., Ford, E. S., Zhao, G.& Mokdad, A. H. Prevalence of pre-diabetes and its association with clustering of cardiometabolic risk factors and hyperinsulinemia among U.S. adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Diabetes Care* (2009) 32, 342-347.
9. Sinha, R. et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N. Engl. J. Med.* (2002) 346, 802-810.
10. Goran, M. I. et al. Impaired glucose tolerance and reduced beta-cell function in overweight Latino children with a positive family history for type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2004) 89, 207-212.
11. Valdes S, Rojo-Martinez G, Soriguer F. Evolution of prevalence of type 2 diabetes in adult Spanish population. *Med Clin* 129:352-355.

12. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Diabetes.es Study. *Diabetología* (2012) 55:88-93.
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553.
14. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diab Care* 1997; 20: 1183-1197
15. Fernández M. Biología molecular de la diabetes mellitus. *Rev Endoc Nutr* 1996; 4 (3): 55-62.
16. Saltiel A. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104: 517- 529.
17. Gerich E. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19: 491-503.
18. Van Tilburg J, Van Haefen, Timon W, Pearson P, Wijmenga C. Defining the genetic contribution of type 2. *J Med Gen* 2001;38(9): 569-578.
19. Kahn C R. Diabetes: a strategic plan for the 21st century. *Diabetes Metab Rev* 1999; 15: 152-155.
20. Wagman A. Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des* 2001; 7(6): 417-50.
21. Rich SS. Mapping genes in diabetes: genetic epidemiological perspective. *Diabetes* 1990; 39: 1315-19.
22. Gaster B, Hirsch Y. The effects of improved glycemic control on complications in type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 1998; 158:134-140.
23. Velho G, Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Europ J Endocrinol* 1998; 138:233-239.

24. Wang Y, Storlien L, Jenkins B, Tapsell L. Dietary variables and glucose tolerance in pregnancy. *Diab Care* 2000;23(4):460-464
25. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Paich JM et al. The prevalence by stage severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993; 43: 817-24.
26. Mohler E R, III. Endothelial disfunción. Uptodate. 2008
27. Cabezas –Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society. Diabetología* 1998; 41: 1263-9.
28. Shamoan, H; Duffy, H; Fleischer, N; Engel, S; et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine.* (1993);329(14): 977-986.
29. Turner, Robert C; Holman, Rury R; Cull, Carole A; Stratton, Irene M; et al. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) *The Lancet* 352.9131(Sep 12, (1998);352.913(Sep 12): 837-53.
30. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:527-32.
31. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 Suppl.1: S79-S83.
32. Turner HE, Wass JAH. *Oxford Handbook of Endocrinology and Diabetes.* Oxford: Oxford University Press, 2003.
33. Salvador-Gonzalez B, Rodríguez-Latre LM, Güell-Miró R, Álvarez-Funes V, Sanz-Ródenas H, Tovillas-Morán J, MACAP RENAL. Estimación del filtrado glomerular según MDRD-4 IDMS y CKD-EPI

en individuos igual o superior a 60 años en atención primaria. *Nefrología* (2013);33(4):552-63

34. Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med* 2004; 82: 510-29.
35. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 2005; 8: 247-68.
36. Geert Jan Biessels, Ian J Deary, Christopher M Ryan. Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol* 2008; 7: 184-90.
37. Hurst RT, Lee RW. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. *Ann Intern Med* 2003; 139: 824-34.
38. Kannel WB. Lipids, diabetes and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Ann Heart J* 1985; 110: 1100-07.
39. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 294-315.
40. Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 1995; 44: 369-74.
41. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Diabetes, other risk factors, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in MRFIT. *Diabetes Care* 1993; 16: 434-44.
42. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109 (23 Suppl 1):III2-III7.
43. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycosylation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114: 597-605.
44. Biller J, Love BB. Diabetes and stroke. *Med Clin of North America* 1993; 77:95-110.

45. Criqui M, Langer R, Fronek A, Feigelson H, Klauber M, McCam T et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992; 326: 381-6.
46. Melton L, Macken K, Palumbo P, Elveback R. Incidence and prevalence of clinical peripheral vascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1980; 3: 650-4.
47. Brem H, Sheehan P, Boulton A. Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 2004; 187 (Suppl May): 1S-10S.
48. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. noviembre de 2008;3 Suppl 3:S131-139.
49. Razzaque MS. The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. noviembre de 2009;5(11):611-9.
50. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*. 23 de julio de 2010;142(2):309-19.
51. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 23 de julio de 2010;142(2):296-308.
52. 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.
53. Pamela G. Robey, Adele L. Boskey. Chapter 3: Extracellular matrix and bone mineralization. *Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism American Society for Bone and Mineral Research*. 5.a ed. Murray J. Favus; 2003.
54. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*. 2005;70:301-39.
55. Bollerslev J, Ueland T, Grodum E, Haug E, Brixen K, Djøseland O. Biochemical markers of bone metabolism in benign human

- osteopetrosis: a study of two types at baseline and during stimulation with triiodothyronine. *Eur J Endocrinol.* julio de 1998;139(1):29-35.
56. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* noviembre de 2005;26(4):97-122.
57. Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(3):126-36.
58. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:33-40.
59. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C.* abril de 2005;25(2):131-43.
60. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2012;13(1):27-38.
61. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* febrero de 2011;343(2):289-302.
62. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res.* marzo de 1998;37(3):586-600.
63. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2012;13(1):27-38.
64. Murray J. Favus. Pamela Gerhon Robey and Adele L. Boskey. Capítulo 3: Matriz extracelular y biomineralización del hueso. En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 6th Edition. 2006.
65. Murray J. Favus. Jane E. Aubin, Jane B. Lian, Gary S. Stein. Formación del hueso: maduración y actividades funcionales de las células de la estirpe osteoblástica. Capítulo 4, pag.30. En: *Primer on the Metabolic*

- Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 6th edition. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2006.
66. Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li Y-P, Dai K, et al. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos Int.* junio de 2012;23(6):1653-63.
67. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 15 de octubre de 2003;17(20):2481-95.
68. Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation? *Bone.* noviembre de 2005;37(5):601-6.
69. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* septiembre de 1989;3(3):953-960; discussion 960-961.
70. Jørgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Civitelli R, Sørensen OH, Steinberg TH. Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 7 de febrero de 2003;278(6):4082-6.
71. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res.* septiembre de 2001;16(9):1575-82.
72. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem.* 8 de marzo de 2002;277(10):8648-57.
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. Razzaque MS. The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* noviembre de 2009;5(11):611-9.
75. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* febrero de 2011;26(2):229-38.

76. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* septiembre de 2010;21(9):1457-69.
77. Jane B. Lian, Gary S. Stein, Jane E. Aubin. Chapter 3. Bone formation: Maturation and functional activities of the osteoblastic lineage. *Primer on Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism* American Society for Bone and Mineral Research. 6.a ed. Murray J.Favus; 2006.
78. Krause C, Korchynskyi O, de Rooij K, Weidauer SE, de Gorter DJJ, van Bezooijen RL, et al. Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem.* 31 de diciembre de 2010;285(53):41614-26.
79. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 20 de mayo de 2005;280(20):19883-7.
80. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 22 de julio de 2005;280(29):26770-5.
81. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. 2001. *Trends MolMed* 7(6): 259-64.
82. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. 2002. *Nature* 418(6893): 41-9.
83. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. 2002. *Cell* 108(1):17-29.
84. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. 2005. *Nat Med* 11(8):880-5.
85. Murray J. Favus. Jane E. Aubin, Jane B. Lian, Gary S. Stein. Formación del hueso: maduración y actividades funcionales de las células de estirpe osteoblástica. Capítulo 4, pag.30. En: *Primer on the Metabolic*

Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 6th edition. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2006.

86. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013; 19: 179-192.
87. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149: 1192-1205.
88. Van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009; 136: 3205-3214.
89. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17:9-26.
90. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; 107: 513-523.
91. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 11-19.
92. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 2002; 39: 91-97.
93. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002; 346: 1513-1521.
94. Gori F, Lerner Ulf, Ohlsson C, Baron R. A new WNT on the bone: WNT16, cortical bone thickness, porosity and fractures. *International Bone & Mineral Society. BoneKey Reports* 4, (2015) 669.
95. Movérare-Skrtic S., Henning P., Xianwen L. et al: Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nature Medicine* 2014; 20 (11):1279-1288
96. Osteoclastogenesis.jpg (imagen JPEG, 1706x1157 píxeles)[Internet]. [citado 21de Noviembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Osteoclastogenesis.jpg>

97. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* febrero de 2000;113 (Pt 3):377-81.
98. Akisaka T, Yoshida H, Inoue S, Shimizu K. Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. *J Bone Miner Res.* julio de 2001;16(7):1248-55.
99. F. Patrick Ross. Chapter 5. Osteoclastic biology and bone resorption. *Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism American Society for Bone and Mineral Research.* 6.a ed. Murray J. Favus; 2006.
100. Holliday LS, Bubb MR, Jiang J, Hurst IR, Zuo J. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J Bioenerg Biomembr.* diciembre de 2005;37(6):419-23.
101. Stenbeck G, Horton MA. Endocytic trafficking in actively resorbing osteoclasts. *J Cell Sci.* 29 de febrero de 2004;117(Pt 6):827-36.
102. Meagher J, Zellweger R, Filgueira L. Functional dissociation of the basolateral transcytotic compartment from the apical phago-lysosomal compartment in human osteoclasts. *J Histochem Cytochem.* mayo de 2005;53(5):665-70.
103. Sakai E, Miyamoto H, Okamoto K, Kato Y, Yamamoto K, Sakai H. Characterization of phagosomal subpopulations along endocytic routes in osteoclasts and macrophages. *J Biochem.* diciembre de 2001;130(6):823-31.
104. Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science.* 11 de abril de 1997;276(5310):270-3.
105. Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology* 2013; 52:226-234
106. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* agosto de 2003;4(8):638-49.

107. Nogués Solán X. J.Gonzalez Macías, J.M. Olmos Martinez. Introducción: fisiopatología del remodelado óseo. Capítulo 1 en Formadores de hueso. Barcelona: Doyma; 2005.
108. Murray J. Favus. Jane E. Aubin, Jane B. Lian, Gary S. Stein. Formación del hueso: maduración y actividades funcionales de las células de la estirpe osteoblástica. Capítulo 4, pag.30. En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 6th edition. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2006.
109. Nogués Solán X. J.Gonzalez Macías, J.M. Olmos Martinez. Introducción: fisiopatología del remodelado óseo. Capítulo 1 en Formadores de hueso. Barcelona: Doyma; 2005.
110. Martin TJ, Quinn JMW, Gillespie MT, Ng KW, Karsdal MA, Sims NA. Mechanisms involved in skeletal anabolic therapies. *Ann N Y Acad Sci.* abril de 2006;1068:458-70.
111. Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res.* abril de 2007;22(4):487-94.
112. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 15 Mayo de 2003;423(6937):349-55.
113. 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.
114. Mannstadt M, Jüppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol.* noviembre de 1999;277(5 Pt 2):F665-675.
115. Riancho Moral JA, González Macías J. Jose Mnuel Quesada. Capítulo 6. Vitamina D. pag. 29 en Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo; 2004
116. Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA.* diciembre de 1985;82(23):8213-7.

117. Riancho Moral JA, González Macías J. Pedro Mezquita, Manuel Muñoz-Torres, Guillermo Alonso. Capítulo 9. Otras hormonas: hormonas tiroideas, GH, glucocorticoides. pag. 43 en Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo; 2004.
118. Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL. Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol.* abril de 2001;26(2):79-94.
119. Leonard J. Deftos. Chapter 18. Calcitonin. Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism American Society for Bone and Mineral Research. 6.a ed. Murray J. Favus; 2006.
120. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2012;13(1):27-38.
121. Riancho Moral JA, González Macías J. Pedro Mezquita, Manuel Muñoz-Torres, Guillermo Alonso. Capítulo 9. Otras hormonas: hormonas tiroideas, GH, glucocorticoides. pag. 47 en Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo; 2004
122. Fulzele K, Clemens TL. Novel functions for insulin in bone. *Bone.* febrero de 2012;50(2):452-6.
123. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 19 de enero de 2012;481(7381):314-20.
124. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* (2011). Vol. 26, No. 4, 677-680.
125. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* (2010), 142, 296-308.
126. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 1 de noviembre de 2002;111(3):305-17.

127. Premaor MO, Pilbrow L, Tonkin C, Parker RA, Compston J. Obesity and fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* febrero de 2010;25(2):292-7
128. Goulding A, Grant AM, Williams SM. Bone and body composition of children and adolescents with repeated forearm fractures. *J Bone Miner Res.* diciembre de 2005;20(12):2090-6.
129. Gregory R. Mundi, Di Chen, Babatunde O. Oyajobi. Chapter 7: Bone remodelling. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism American Society for Bone and Mineral Research.* 5.a ed. Murray J. Favus; 2003. p. 51-63.
130. Neyro Bilbao, J.L, Cano Sánchez, A., Palacios Gil-Antuñano, S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 3:105-12.
131. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology.* septiembre de 2000;141(9):3478-84.
132. Neyro Bilbao, J.L., Cano Sanchez, A., Palacios Gil-Antuñano, S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 3:105-12.
133. Morote J, Planas J. [Loss of bone mass in patients with prostate cancer subjected to androgenic deprivation]. *Actas Urol Esp.* Abril de 2011; 35(4): 232-9.
134. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol.* enero de 2009;88(1):1-17.
135. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 17 de abril de 1998;93(2):165-76.
136. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* diciembre de 2001;142(12):5050-5.

137. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* junio de 2001;79(5-6):243-53.
138. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(5): 3212-18
139. Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res.* 23 de julio de 2012; 14(4):R112.
140. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* Diciembre de 2004;15(6):457-75
141. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 13 de noviembre de 1997;390(6656):175-9.
142. Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem.* 7 de mayo de 1999;274(19):13613-8.
143. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 3 de mayo de 1999;145(3):527-38.
144. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 3 de octubre de 1997;272(40):25190-4.

145. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 de febrero de 2000;97(4):1566-71.
146. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 15 de septiembre de 1999;13(18):2412-24.
147. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 31 de marzo de 1998;95(7):3597-602.
148. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem*. 14 de julio de 2000;275(28):20959-62.
149. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 7 de septiembre de 1998;188(5):997-1001.
150. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 28 de enero de 1999;397(6717):315-23.
151. Baudhuin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. *Expert Rev Anticancer Ther*. febrero de 2007;7(2):221-32.
152. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 18 de abril de 1997;89(2):309-19.
153. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and

- osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. marzo de 1998;139(3):1329-37.
154. 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.
 155. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 29 de junio de 1998;247(3):610-5.
 156. Kikuta J and Ishii M. Osteoclast migration, differentiation a function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology* 2013;52:226-234
 157. Weber G, Beccaria L, de Angelis M, Mora S, Galli L et al. Bone mass in Young patients with type I diabetes. *Bone Miner*. Enero de 1990;8(1):23-30
 158. Hui SL, Epstein S, Johnston CC Jr. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. Enero de 1985;60(1):74-80
 159. Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 295-303.
 160. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1196-2000
 161. Lopez-Ibarra PJ, Pastor MM, Escobar-Jimenez F, Pardo MD, Gonzalez AG, Luna JD, et al. Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr Pract* 2001; 7: 346-51.
 162. Forst T, Pfützner A, Kann P, Schehler B, Lobmann R, Schäfer H, et al. Peripheral osteopenia in adult patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*. octubre de 1995;12(10):874-9. 24.

163. Kayath MJ, Dib SA, Vieira JG. Prevalence and magnitude of osteopenia associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat.* junio de 1994;8(2):97-104. 25.
164. Compston JE, Smith EM, Matthews C, Schofield P. Whole body composition and regional bone mass in women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf).* septiembre de 1994;41(3):289-93. 26.
165. Mastrandrea LD, Wactawski-Wende J, Donahue RP, Hovey KM, Clark A, Quattrin T. Young women with type 1 diabetes have lower bone mineral density that persists over time. *Diabetes Care.* septiembre de 2008;31(9):1729-35.
166. Vestegaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and 2 diabetes – a metaanalysis. *Osteoporos Int.* 2007 Apr;18(4):427-44.
167. Vázquez Gámez MA, Marín Pérez JM, Montoya García MJ, Moruno García RM, Argüelles Martín F, Pérez Cano R.: Evolution of bone mass in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Med. Clin.* 2008 19;130 (14): 526-30
168. De Liefde II, van der Klift M, de Laet CEDH, van Daele PLA, Hofman A, Pols HAP. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int.* diciembre de 2005;16(12):1713-20.
169. Kwon DJ, Kim JH, Chung KW, Kim JH, Lee JW, Kim SP, et al. Bone mineral density of the spine using dual energy X-ray absorptiometry in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res.* abril de 1996;22(2):157-62.
170. Wakasugi M, Wakao R, Tawata M, Gan N, Koizumi K, Onaya T. Bone mineral density measured by dual energy x-ray absorptiometry in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Bone.* 1993;14(1):29-33.
171. Majima T, Komatsu Y, Yamada T, Koike Y, Shigemoto M, Takagi C, et al. Decreased bone mineral density at the distal radius, but not at

- the lumbar spine or the femoral neck, in Japanese type 2 diabetic patients. *Osteoporos Int.* agosto de 2005;16(8):907-13.
172. Isaia, G.C., Ardisson, P., Di Stefano, M., Ferrari, D, Martina, V., Porta, M, et al. *Acta Diabetologica*, Volume 36, Numbers 1-2 - SpringerLink. *Acta Diabetologica*. 1999;36(1-2):35-8.
173. Strotmeyer ES, Cauley JA, Schwartz AV, Nevitt MC, Resnick HE, Zmuda JM, et al. Diabetes is associated independently of body composition with BMD and bone volume in older white and black men and women: The Health, Aging, and Body Composition Study. *J Bone Miner Res.* julio de 2004;19(7):1084-91.
174. Melton LJ 3rd, Riggs BL, Leibson CL, Achenbach SJ, Camp JJ, Bouxsein ML, et al. A bone structural basis for fracture risk in diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* diciembre de 2008;93(12):4804-9.
175. Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* diciembre de 2005;16(12):1506-12.
176. De Liefde I, Van der Klift M, De Laet CE, Van Daele PL Hofman A, Pols HA. Bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporosis International* 2005; 16: 1713-20
177. Dennison EM, Syddall HE, Aihie Sayer A, Craighead S, Phillips DI, Cooper C. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased axial bone density in men and women from the Hertfordshire Cohort Study: evidence for an indirect effect of insulin resistance. *Diabetología* 2004; 47: 1963-8.
178. Sert M, Tetiker T, Kirim S, Soyupak S, Canataroglu A, Kocak M. Type 2 diabetes mellitus and osteopenia: is there an association. *Acta Diabetología* 2003; 40: 105-8.
179. Pérez-Castrillón J-L, De Luis D, Martín-Escudero JC, Asensio T, del Amo R, Izaola O. Non-insulin-dependent diabetes, bone mineral

- density, and cardiovascular risk factors. *J Diabetes Complicat.* diciembre de 2004;18(6):317-21.
180. Sosa M, Saavedra P, Jódar E, Lozano-Tonkin C, Quesada JM, Torrijos A, et al. Bone mineral density and risk of fractures in aging, obese post-menopausal women with type 2 diabetes. The GIUMO Study. *Aging Clin Exp Res.* febrero de 2009;21(1):27-32.
181. Johal KS, Boulton C, Moran CG. Hip fractures after falls in hospital: a retrospective observational cohort study. *Injury.* febrero de 2009;40(2):201-4.
182. Barrett-Connor E, Weiss TW, McHorney CA, Miller PD, Siris ES. Predictors of falls among postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). *Osteoporos Int.* mayo de 2009;20(5):715-22.
183. Volpato S, Leveille SG, Blaum C, Fried LP, Guralnik JM. Risk factors for falls in older disabled women with diabetes: the women's health and aging study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* diciembre de 2005;60(12):1539-45.
184. Wallace C, Reiber GE, LeMaster J, Smith DG, Sullivan K, Hayes S, et al. Incidence of falls, risk factors for falls, and fall-related fractures in individuals with diabetes and a prior foot ulcer. *Diabetes Care.* noviembre de 2002;25(11):1983-6.
185. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet.* 3 de octubre de 2009;374(9696):1196-208.
186. Mayne D, Stout NR, Aspray TJ. Diabetes, falls and fractures. *Age Ageing.* septiembre de 2010;39(5):522-5.
187. Dobnig H, Piswanger-Sölkner JC, Roth M, Obermayer-Pietsch B, Tiran A, Strele A, et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* septiembre de 2006;91(9):3355-63.
188. Kannus P, Sievänen H, Palvanen M, Järvinen T, Parkkari J. Prevention of falls and consequent injuries in elderly people. *Lancet.* 26 de noviembre de 2005;366(9500):1885-93.

189. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc.* enero de 2011;86(1):50-60.
190. Moseley KF. Type 2 diabetes and bone fractures. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* Abril de 2012; 19(2):128-35
191. Pothuaud L, Barthe N, Krieg MA, Mehsen N, Carceller P, Hans D. Evaluation of the potential use of trabecular bone score to complement bone mineral density in the diagnosis of osteoporosis: a preliminary spine BMD-matched, case-control study. *J Clin Densitom.* 2009;12(2):170-176.
192. Bousson V, Bergot C, Sutter B, Levitz P, Cortet B. Trabecular bone score (TBS): available knowledge, clinical relevance, and future prospects. *Osteoporosis International.* 2011;23(5):1489-1501.
193. Hans D, Barthe N, Boutroy S, Pothuaud L, Winzenrieth R, Krieg MA. Correlations between trabecular bone score, measured using anteroposterior dual-energy X-ray absorptiometry acquisition, and 3-dimensional parameters of bone microarchitecture: an experimental study on human cadaver vertebrae. *J Clin Densitom.* 2011;14(3):302-312
194. Roux JP, Wegrzyn J, Boutroy S, Hans D, Chapurlat R. Relationship between trabecular bone score (TBS) bone mass and microarchitecture in human vertebrae: an ex vivo study. *Osteoporosis International.* 2012; 23 (suppl 2):S 327.
195. Hans D, Goertzen AL, Krieg MA, Leslie WD. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2762-2763
196. Rabier B, Heraud A, Grand-Lenoir C, Winzenrieth R, Hans D. A multicenter, retrospective case-control study assessing the role of trabecular bone score (TBS) in menopausal Caucasian women with low areal bone mineral density (BMDa): analyzing the odds of vertebral fracture. *Bone.* 210;46(1):176-181.

197. Breban S, Briot K, Kolta S, et al. Identification of rheumatoid arthritis patients with vertebral fractures using bone mineral density and trabecular bone score. *J Clin Densitom.* 2012;15(3):260-266.
198. Winzenrieth R, Dufour R, Pothuaud L, Hans D. A retrospective case-control study assessing the role of trabecular bone score in postmenopausal Caucasian women with osteopenia: analyzing the odds of vertebral fracture. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(2):104-109
199. Leslie WD, Aubry-Rozier B, Lamy O, and Hans D. TBS(trabecular bone score) and diabetes-related fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):602-609
200. Kelsey JL, Browner WS, Seeley DG, Nevitt MC, Cummings SR. Risk factors for fractures of the distal forearm and proximal humerus. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 477-89
201. Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey.
202. Janghorbani M, Feskanich D, Willett WC, Hu F. Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: The Nurse's Health Study. *Diabetes Care* 2006; 29: 1573-8.
203. Eleanor J Hothersall, Shona J Livingstone, Helen C Looker, S Faisal Ahmed, Steve Cleland. Contemporary Risk of Hip Fracture in Type 1 and Type 2 Diabetes: A National Registry Study From Scotland. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014; 29, No.5: 1054-1060.
204. Hothershall EJ, Livingstone SJ, Looker HC, Ahmed SF, Cleland S et al. Contemporary risk of hip fracture in type 1 and type 2 diabetes. A national registry study from Scotland. *J Bone Miner Res.* 2014;29(5):1054-1060.
205. Janghorbani M., Van Dam R.M., Willett W.C., Hu F.B.: Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. *Am. J. Epidemiol.* (2007) 166 (5): 495-505

206. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care*. 2001;24(7): 1192-7.
207. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 32-8.
208. Schwartz AV. Epidemiology of fractures in type 2 diabetes. *Bone*. 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.032>
209. Yamamoto M, Yamaguchi T., Hiroshi Kaji J., Sugimoto T. : Diabetic Patients Have an Increased Risk of Vertebral Fractures Independent of BMD or Diabetic Complications. *J. Bone Miner. Res.* 2009;24:702-709.
210. Abdalrahman N, McComb C, Foster JE, McLean J, Lindsay RS et al. Deficits in trabecular bone microarchitecture in young women with type 1 diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2015;30(8):1386-93
211. Patsch JM, Burghardt AJ, Yap SP, Baum T, Schwartz AV et al. Increased cortical porosity in type 2 diabetic postmenopausal women with fragility fractures. *J Bone Miner Res.* 2013;28(2):313-24
212. Farr JN, Drake MT, Amin S, Melton III LJ, McCready K, Khosla S et al. In Vivo Assessment of Bone Quality in Postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* (2014); 29(4): 787-95
213. Botushanov NP, Orbetzova MM. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*. diciembre de 2009;51(4):12-7.
214. Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res.* julio de 1988;(232):210-6.
215. Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, McLean J, Krothapalli N, Faibish D, et al. TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *J Bone Miner Res.* julio de 2010;25(7):1604-15.
216. Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage

- during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone*. febrero de 2009;44(2):357-63.
217. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* (Print). 2010;191(6):453-65.
218. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*. julio de 2009;45 Suppl 1:S35-38.
219. Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*. junio de 2007;8(5):519-25.
220. Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H. Possible participation of advanced glycation end products in the pathogenesis of osteoporosis in diabetic patients. *Med Hypotheses*. 2005;65(6):1013-5.
221. Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. abril de 2007;92(4):1305-10.
222. Inaba M, Terada M, Koyama H, Yoshida O, Ishimura E, Kawagishi T, et al. Influence of high glucose on 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced effect on human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res*. julio de 1995;10(7):1050-6.
223. Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, Aruldhas MM, Srinivasan N. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. *Biochem Cell Biol*. febrero de 2006;84(1):93-101.
224. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*. febrero de 2007;40(2):345-53.

225. Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, et al. Advanced glycation end-product N(ϵ)-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*. abril de 2012;221(2):387-96.
226. Mercer N, Ahmed H, McCarthy AD, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM. AGE-R3/galectin-3 expression in osteoblast-like cells: regulation by AGEs. *Mol Cell Biochem*. noviembre de 2004;266(1-2):17-24.
227. Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. enero de 2001;28(1):21-8.
228. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, et al. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone*. enero de 1998;22(1):17-23.
229. García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. enero de 2012;50(1):276-88.
230. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone*. junio de 2008;42(6):1122-30.
231. Wang W, Zhang X, Zheng J, Yang J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem*. mayo de 2010;338(1-2):115-22.
232. Yamamoto T. [The role of AGEs for the pathogenesis of osteopenia in diabetes mellitus]. *Clin Calcium*. agosto de 2006;16(8):1322-6.
233. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell*. julio de 1998;9(7):1903-18.
234. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. enero de 2003;144(1):346-52.

235. Botolin S, Faugere M-C, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology*. agosto de 2005;146(8):3622-31.
236. Liu Z, Aronson J, Wahl EC, Liu L, Perrien DS, Kern PA, et al. A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes. *Acta Orthop*. febrero de 2007;78(1):46-55.
237. Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M. Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats. *Bone*. febrero de 2008;42(2):372-9.
238. Hui SL, Epstein S, Johnston CC Jr. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. enero de 1985;60(1):74-80.
239. Forst T, Pfützner A, Kann P, Schehler B, Lobmann R, Schäfer H, et al. Peripheral osteopenia in adult patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*. octubre de 1995;12(10):874-9.
240. Kayath MJ, Dib SA, Vieira JG. Prevalence and magnitude of osteopenia associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat*. junio de 1994;8(2):97-104
241. Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*. noviembre de 2008;43(5):813-8.
242. Cornish J, Callon KE, Bava U, Watson M, Xu X, Lin JM, et al. Preptin, another peptide product of the pancreatic beta-cell, is osteogenic in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. enero de 2007;292(1):E117-122.
243. Horcajada-Molteni MN, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Coxam V, Young A, et al. Amylin and bone metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Bone Miner Res*. mayo de 2001;16(5):958-65.
244. Thrailkill KM, Lumpkin CK Jr, Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for

- clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* noviembre de 2005;289(5):E735-745.
245. Campos Pastor MM, López-Ibarra PJ, Escobar-Jiménez F, Serrano Pardo MD, García-Cervigón AG. Intensive insulin therapy and bone mineral density in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *Osteoporos Int.* 2000;11(5):455-9.
246. Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, et al. Visceral fat is a negative predictor of bone density measures in obese adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo de 2010;95(3):1247-55.
247. Premaor MO, Pilbrow L, Tonkin C, Parker RA, Compston J. Obesity and fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* febrero de 2010;25(2):292-7.
248. Allet L, Armand S, Golay A, Monnin D, de Bie RA, de Bruin ED. Gait characteristics of diabetic patients: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev.* abril de 2008;24(3):173-91.
249. Rosen CJ, Klibanski A. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. *Am J Med.* mayo de 2009;122(5):409-14. 84.
250. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol.* enero de 2006;2(1):35-43.
251. Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol.* julio de 2009;5(7):365-72.
252. De Paula FJA, Horowitz MC, Rosen CJ. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes Metab Res Rev.* noviembre de 2010;26(8):622-30
253. Teijeira-Fernandez E, Eiras S, Grigorian-Shamagian L, Salgado-Somoza A, Martinez-Comendador JM, Gonzalez-Juanatey JR. Diabetic and nondiabetic patients express similar adipose tissue adiponectin and leptin levels. *Int J Obes (Lond).* julio de 2010;34(7):1200-8.
254. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Relationships between serum adiponectin levels versus

- bone mineral density, bone metabolic markers, and vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. febrero de 2009;160(2):265-73.
255. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S, et al. Adiponectin is associated with changes in bone markers during glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. agosto de 2009;94(8):3031-7.
256. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*. 23 de julio de 2010;142(2):309-19.
257. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 10 de agosto de 2007;130(3):456-69.
258. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1 de agosto de 1996;382(6590):448-52.
259. Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, Morino K, Nishio Y, Bryer-Ash M, et al. Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in 16 myocytes and Fao hepatoma cells. *J Biol Chem*. 30 de marzo de 2001;276(13):207-11.
260. Eva María Díaz Diego. Osteocalcina: Evaluación de diferentes ensayos utilizados para su medida. Aplicación al estudio de las formas inmunorreactivas presentes en el medio de cultivo de osteoblastos humanos y circulantes en suero [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense; 1996. Recuperado a partir de: <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/1/D1023601.pdf>
261. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 10 de agosto de 2007;130(3):456-69.

262. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 de abril de 2008;105(13):5266-70.
263. 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.
264. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*. julio de 2009;45 Suppl 1:S35-38.
265. McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem*. 15 de diciembre de 2007;102(6):1343-57.
266. Gregorio F, Cristallini S, Santeusanio F, Filipponi P, Fumelli P. Osteopenia associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus: what are the causes? *Diabetes Res Clin Pract*. febrero de 1994;23(1):43-54.
267. Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. enero de 2001;28(1):21-8.
268. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, et al. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone*. enero de 1998;22(1):17-23.
269. García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. enero de 2012;50(1):276-88.
270. Wang W, Zhang X, Zheng J, Yang J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem*. mayo de 2010;338(1-2):115-22.
271. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kono K, Goto S, Komaba H, et al. The effects of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic conditions. *Endocrine*. diciembre de 2010;38(3):369-76.

272. Guan C-C, Yan M, Jiang X-Q, Zhang P, Zhang X-L, Li J, et al. Sonic hedgehog alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Bone*. diciembre de 2009;45(6):1146-52.
273. D'Erasmus E, Pisani D, Ragno A, Raejntroph N, Letizia C, Acca M. Relationship between serum albumin and bone mineral density in postmenopausal women and in patients with hypoalbuminemia. *Horm Metab Res*. junio de 1999;31(6):385-8.
274. Okazaki R, Toriumi M, Tanaka K. [Endocrine disorders in diabetes mellitus]. *Nippon Rinsho*. octubre de 1997;55 Suppl:667-72.
275. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Sugimoto T. Low serum level of the endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) is a risk factor for prevalent vertebral fractures independent of bone mineral density in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. diciembre de 2009;32(12):2263-8.
276. Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, Feingold KR, et al. Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. julio de 2009;94(7):2380-6.
277. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*. 30 de enero de 1981;211(4481):491-3.
278. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223-34.
279. Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, et al. Advanced glycation end-product N(ε)-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*. abril de 2012;221(2):387-96.
280. De Paula FJA, Horowitz MC, Rosen CJ. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes Metab Res Rev*. noviembre de 2010;26(8):622-30
281. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an

environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10 de junio de 1997;94(12):6474-9.

282. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. marzo de 1998;37(3):586-600.
283. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. mayo de 2008;22(5):1572-80.
284. Morales S, García-Salcedo JA, Muñoz-Torres M. Pentosidina. un nuevo biomarcador de las complicaciones de la diabetes mellitus. *Medicina clínica*. 136(7):298-302.
285. Franke S, Rüster C, Pester J, Hofmann G, Oelzner P, Wolf G. Advanced glycation end products affect growth and function of osteoblasts. *Clin Exp Rheumatol*. agosto de 2011;29(4):650-60.
286. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 8 de agosto de 2006;114(6):597-605.
287. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. mayo de 2008;22(5):1572-80.
288. Torres MC, Beltrame MH, Santos ICR, Picheth G, Petzl-Erlor ML, Pedrosa FO, et al. Polymorphisms of the promoter and exon 3 of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in Euro- and Afro-Brazilians. *Int J Immunogenet*. abril de 2012;39(2):155-60.
289. Morales S, García-Salcedo JA, Muñoz-Torres M. Pentosidina. un nuevo biomarcador de las complicaciones de la diabetes mellitus. *Medicina clínica*. 136(7):298-302.
290. Sterenczak KA, Willenbrock S, Barann M, Klemke M, Soller JT, Eberle N, et al. Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcript forms. *Gene*. 1 de abril de 2009;434(1-2):35-42.

291. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kono K, Goto S, Komaba H, et al. The effects of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic conditions. *Endocrine*. diciembre de 2010;38(3):369-76.
292. Sterenczak KA, Willenbrock S, Barann M, Klemke M, Soller JT, Eberle N, et al. Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcript forms. *Gene*. 1 de abril de 2009;434(1-2):35-42.
293. Yan SD, Stern D, Schmidt AM. What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose. *Eur J Clin Invest*. marzo de 1997;27(3):179-81.
294. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*. febrero de 1994;70(2):138-51.
295. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. marzo de 1998;37(3):586-600.
296. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*. febrero de 2007;40(2):345-53.
297. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes*. 15 de marzo de 2011;2(3):41-8.
298. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*. julio de 2005;48(7):1292-9.
299. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*. 24 de abril de 2006;536(1-2):38-46.

300. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 23 de julio de 2010;142(2):296-308
301. Ma P, Gu B, Xiong W, Tan B, Geng W, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblast via the PI3 K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment. *Plos ONE*. 2014;9(11):e112243
302. Moreau R, Aubin R, Lapointe JY, Lajeunesse D. Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res*. 1997;12(12):1984-92.
303. Zinman B, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, Lachin JM, et al. Effect of rosiglitazone, metformin, and glyburide on bone biomarkers in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(1):134-42
304. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Sugimoto T. Relationship between treatments with insulin and oral hypoglycemic agents versus the presence of vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(5):554-60
305. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetología*. 2005;48(7):1292-9
306. Melton LJ 3rd, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res*. 2008;23(8):1334-42
307. Lapane KL, Yang S, Brown MJ, Jawahar R, Pagliasotti C, Rajpathak S. Sulfonylureas and risk of falls and fractures: a systematic review. *Drugs Aging*. 2013; 30(7):527-47
308. Wan Y. PPARgamma in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(12):722-8
309. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, et al. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast

- formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 2004;113(6):846-55
310. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem.* 1999;74(3):357-71
311. Wan Y, Chong LW, Evans RM. *PPAR-gamma* regulates osteoclastogenesis in mice. *Nature Med.* 2007;13(12):1496-503
312. Grey A. Thiazolidinedione-induced skeletal fragility-mechanisms and implications. *Diab Obes Metab.* 2009;11(4):275-84
313. Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR, Swain FL, Suva LJ, Lecka-Czernik B. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology.* 2007;148(6):2669-80
314. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology.* 2005;146(3):1226-35
315. Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(4):1305-10
316. Berberoglu Z, Gursoy A, Bayraktar N, Yazici AC, Bascil Tutuncu N et al. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3523-30
317. Gruntmanis U, Fordan S, Ghayee HK, Abdullah SM, See R, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone increases bone resorption in women with type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. *Calcif Tis Int.* 2010; 86(5):343-9
318. Grey A, Bolland M, Fenwick S, Horne A, Gamble G et al. The skeletal effects of pioglitazone in type 2 diabetes or impaired glucose

- tolerance: a randomized controlled trial. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(2):255-62
319. Bone HG, Lindsay R, McClung MR, Perez AT, Raanan MG, et al. Effects of pioglitazone on bone in postmenopausal women with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):4691-701
320. Borges JL, Bilezikian JP, Jones-Leone AR, Acosta AP, Ambery PD, et al. A randomized, parallel group, double-blind, multicenter study comparing the efficacy and safety of Avandamet (rosiglitazone/metformin) and metformin on long-term glycaemic control and bone mineral density after 80 weeks of treatment in drug-naïve type 2 diabetes mellitus patients. *Diab Obes Metab.* 2011;13(11):1036-46
321. Bilezikian JP, Josse RG, Eastell R, Lewiecki EM, Miller CG, et al. Rosiglitazone decreases bone mineral density and increases bone turnover in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):1519-28
322. Harslof T, Wamberg L, Moller L, Stodkilde-Jorgensen H, Ringgaard S, et al. Rosiglitazone decreases bone mass and bone marrow fat. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1541-8
323. Glintborg D, Andersen M, Hagen C, Heickendorff L, Hermann AP. Association of pioglitazone treatment with decreased bone mineral density in obese premenopausal patients with polycystic ovary syndrome: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1696-701
324. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamamoto M, Yamauchi M et al. Baseline atherosclerosis parameter could assess the risk of bone loss during pioglitazone treatment in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis Int* 2010;21(12):2013-8
325. Bray GA, Smith SR, Banerji MA, Tripathy D, Clement SC, et al. Effect of pioglitazone on body composition and bone density in subjects

- with prediabetes in the ACT NOW trial. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(10):931-7
326. Zhu ZN, Jiang YF, Ding T. Risk of fracture with thiazolidinediones: an updated meta-analysis of randomized clinical trials. *Bone.* 2014;68:115-23
327. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med.* 2006; 355(23):2427-43
328. Zhu ZN, Jiang YF, Ding T. Risk of fracture with thiazolidinediones: an updated meta-analysis of randomized clinical trials. *Bone.* 2014;68:115-23
329. Aubert RE, Herrera V, Chen W, Haffner SM, Pendergrass M. Rosiglitazone and pioglitazone increase fracture risk in women and men with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(8):716-21
330. Colhoun HM, Livingstone SJ, Looker HC, Morris AD, Wild SH et al. Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs. *Diabetología.* 2012;55(11):2929-37
331. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetología* 2005;48:1292-1299
332. Monami M, Cresci B, Colombini A et al. Bone fractures and hypoglycemic treatment in type 2 diabetic patients: a case-control study. *Diabetes Care* 2008;31:199-203
333. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type2 diabetic and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int* 2009;84:453-461
334. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Nunez S et al. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Pept* 2010;159:61-66

335. Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2474-6
336. Scirica BM, Bhatt DL, Branunwald E, Steg PG, Davidson J, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2013;369(14):1317-26
337. Hirshberg B, Parker A, Edelberg H, Donovan M, Iqbal N, et al. Safety of saxagliptin: events of special interest in 9156 patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(7):556-69
338. Driessen JH, van Onzenoort HA, Henry RM, Lalmohamed A, van den Bergh JP, et al. Use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Bone*. 2014;68:124-30
339. Ljunggren O, Bolinder J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM et al. Dapagliflozin has no effect on markers of bone formation and resorption or bone mineral density in patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(11):990-9
340. Bolinder J, Lunggren O, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM et al. Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2014;16(2):159-69
341. FDA. Canagliflozin: clinical efficacy and safety. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM336234.pdf>
342. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S 2005 Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 352: 1959-1966.
343. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88

344. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153:1133-40.
345. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, Hofmann TJ, Persons DA, Horwitz EM. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11761-6.
346. Fujikawa Y, Quinn JMW, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996;137:4058-60
347. Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in the bone marrow. In: Heersche JNM, Kanis JA, eds. *Bone and mineral research*. Vol.6. Amsterdam: Elsevier Press, 1990:243-72.
348. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science* 1999; 284:143-7.
349. Pignolo RJ, Moustapha Kassem. Circulating Osteogenic Cells: Implications for Injury, Repair, and Regeneration *JBMR*, Vol.26.No 8, August 2011, 1685-1693
350. Alm JJ, Koivu HM, Heino TJ, Hentunen TA, Laitinen S, Aro HT. Circulating plastic adherent mesenchymal stem cell in aged hip fracture patients. *J Orthop Res*. 2010; 28: 1634-1642.
351. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Bone marrow derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354:435-458.
352. Suda RK, Billings PC, Egan KP, et al. Circulating osteogenic precursor cells in heterotopic bone formation. *Stem Cells*.2009; 27:2209-2219.
353. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008;117:2938-2948.
354. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high

- levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 379-388.
355. Campbell GR, Campbell JH. Vascular smooth muscle and arterial calcification. *Z Kardiol.* 2000; 89 (suppl 2): 54-62.
356. Gossel M, Modder UI, Atkinson EJ, Lerma A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1314-1325.
357. Canalis E. The fate of circulating osteoblasts. *N Engl J Med.* 2005;352:2014-2016
358. Kumagai K, Vasanthi A, Drazba JA, Butler RS, Muschler GF. Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into de fracture healing site in the parabiotic mice model. *J Orthop Res* 2008;26:165-175.
359. D'Amelio P, Cristofaro MA, Grimaldi A, Ravazzoli M, Pluviano F, Grosso E, Pescarmona GP, Isaia GC. The role of circulating bone cell precursors in fracture healing. *Calcif Tissue Int* 2010;86:463-469.
360. Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R. Effect of recombinant human parathyroid hormone on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146:326-339.
361. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA. Effect of parathyroid hormone on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-1441.
362. Undale A, Srinivasan B, Drake M, McCready L, Atkinson E. Circulating osteogenic cells: characterization and relationship to rates of bone loss in postmenopausal women. *Bone* 2010;47:83-92.
363. D'Amelio P, Tamone C, Sassi F, D'Amico L, Roato I. Teriparatide increases the maturation of circulating osteoblast precursors. *Osteoporos Int* 2012; 23:1245-1253.

364. Manavalan JS, Cremers S, Dempster DW, Zhou H, Dworakowski E et al. Circulating osteogenic precursor cells in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012, 97(9): 3240-3250
365. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 2007; vol.30,no.5,pp.1305-1313.
366. Doehring LC, Heeger C, Aherrahrou Z et al, Myeloid CD34+CD13+ precursor cells transdifferentiate into chondrocyte-like cells in atherosclerotic intimal calcification. *American Journal of Pathology* 2010; vol 177, n°1, pp. 473-480.
367. Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; vol 52, n°16, pp 1314-1325.
368. Gossel M, Modder UI, Gulati R, et al. Coronary endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2010; 31(23):2909-2914.
369. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilization after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006; vol49, n°12,pp 3075-3084.
370. Flammer JA, Gössl M, Li J, Matsuo Y, Reriani M et al. Patients with an HbA1c in the prediabetic and diabetic range have higher numbers of circulating cells with osteogenic and endothelial progenitor cell markers. *J Clin Endocrinol Metab.* (2012); 97(12): 4761-68.
371. R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end-products: a review, *Diabetologia* 44 (2) (2001) 129e146.
372. Sekido H, Suzuki T, Jomori T, Takeuchi M, Yabe-Nishimura C, Yagihashi S. Reduced cell replication and induction of apoptosis by advanced glycation end products in rat Schwann cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004);320 (1): 241-248.

373. S. Yamagishi, Y. Inagaki, T. Okamoto, S. Amano, K. Koga, M. Takeuchi, Z. Makita. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.* (2002);277(23): 20309-20315.
374. Tanaka K ,Yamaguchi T, Kanazawa I, Sugimoto T. Effects of high glucose and advanced glycation end products on the expressions of sclerostin and RANKL as well as apoptosis in osteocyte-like MLO-Y4-A2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (2015); 46: 193-99
375. N. Ogawa, T. Yamaguchi, S. Yano, M. Yamauchi, M. Yamamoto, T. Sugimoto, The combination of high glucose and advanced glycation end-products (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs, *Horm. Metab. Res.*(2007);39(12):871-875.
376. K. Okazaki, T. Yamaguchi, K. Tanaka, M. Notsu, N. Ogawa, S. Yano, T. Sugimoto, Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis, *Calcif. Tissue Int.* (2012);91(4): 286-296.
377. K. Tanaka, T. Yamaguchi, H. Kaji, I. Kanazawa, T. Sugimoto, Advanced glycation end products suppress osteoblastic differentiation of stromal cells by activating endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013);438(3): 463-467.
378. M. Notsu, T. Yamaguchi, K. Okazaki, K.I. Tanaka, N. Ogawa, I. Kanazawa, T. Sugimoto, Advanced glycation end product 3 (AGE3) suppresses the mineralization of mouse stromal ST2 cells and human mesenchymal stem cells by increasing TGF- β expression and secretion, *Endocrinology* (2014);155(7): 2402-2410.
379. Ehnert S, Freude T, Inle C, Mayer L, Braun B et al. Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation – Description of a novel in vitro model.

Experimental Cell Research. (2015);
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.011>

380. Metabolismo óseo en pacientes con DM tipo 2 y fractura de cadera. Estudio histomorfométrico, resistencia ósea y expresión génica en cultivos primarios de osteoblastos. Tesis Doctoral : Cristina Miranda Diaz. Universidad de Sevilla 2014.
381. Ford ES, Zhao G, Li C. Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* (2010) 55:1310–1317
382. Nasir K, Santos RD, Tufail K, Rivera J, Carvalho JA et al. High-normal fasting blood glucose in non-diabetic range is associated with increased coronary artery calcium burden in asymptomatic men. *Atherosclerosis* (2007):195;55–160
383. Fadini GP, Rattazzi M, Matsumoto T, Asahara T, Khosla S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circulation* .(2012):125;2772–2781
384. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34/CD133/VEGFR-2 endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res*. (2006): 98;e20–e25
385. Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*(2008): 52;1314-1325
386. Gössl M, Mödder UI, Gulati R, Rihal CS, Prasad A, et al. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with coronary retention of osteogenic endothelial progenitor cells. *Eur Heart J*(2010): 31; 2909–2914
387. Flammer AJ, Gössl M, Widmer RJ, Reriani M, Lennon R, et al. Osteocalcin positive progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis. *Eur Heart J*(2012): 10.1093/eurheartj/ehs235
388. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Agostini C, et al. Procalcific phenotypic drift of circulating progenitor cells in type 2 diabetes with coronary artery disease. *Exp Diabetes Res* (2012):921685

IX. ANEXOS

ANEXO I

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Se trata de un estudio observacional en el que no se va a manipular ninguna de las muestras obtenidas de las personas incluidas en el estudio, ni se le va a someter a ninguna prueba experimental.

Los estudios se realizarán en el laboratorio, a partir de una muestra de sangre periférica, y directamente, se valorará la densidad mineral ósea de su esqueleto mediante densitometría ósea.

Importancia:

A través de este proyecto de investigación queremos conocer si la diabetes mellitus puede tener repercusiones sobre el metabolismo óseo que haga que se padezca más frecuentemente de osteoporosis. Detectando este proceso a edades muy precoces nos permitirá prevenir este problema en un futuro

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Riesgo mínimo inherente a la extracción de una muestra de sangre venosa a nivel periférico. La densitometría ósea, si bien es una técnica radiológica, emite una radiación muy pequeña (la décima parte de una radiografía de torax), es una técnica rápida y utilizada ampliamente en la población infantil.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal del Servicio de Medicina Interna del Hospital Virgen Macarena de Sevilla, en el teléfono:

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

INFLUENCIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU CONTROL METÁBOLICO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE ESTIRPE OSTEABLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA, EN NIÑOS Y ADULTOS JÓVENES

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio INFLUENCIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU CONTROL METÁBOLICO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE ESTIRPE OSTEABLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA, EN NIÑOS Y ADULTOS JÓVENES

He recibido suficiente información sobre el estudio INFLUENCIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU CONTROL METÁBOLICO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE ESTIRPE OSTEABLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA, EN NIÑOS Y ADULTOS JÓVENES He hablado con el profesional sanitario informador: Dr. Ramón Pérez Temprano

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

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 *proyecto titulado* INFLUENCIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU CONTROL METÁBOLICO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE ESTIRPE OSTEABLÁSTICA EN SANGRE PERIFÉRICA, EN NIÑOS Y ADULTOS JÓVENES

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha:

Nombre y apellidos:

Fecha:

ANEXO II



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

DR. D. MIGUEL ANGEL RICO CORRAL, PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U. VIRGEN MACARENA Y ÁREA DE SEVILLA

CERTIFICA

Que en la sesión de la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria, celebrada el 13 de junio de 2008, dicha Comisión aprobó el estudio titulado:

“Influencia de la Diabetes Mellitus Tipo 1 y su control metabólico sobre la proporción de células de estirpe osteoblástica en sangre periférica, en niños y adultos jóvenes.”

Presentado por el Dr. Ramón Pérez Cano, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

Y para que conste, firmo el presente documento en Sevilla, a 24 de enero de 2012

Fdo. Miguel Angel Rico Corral
Presidente CEI de centro H.U. Virgen Macarena



X. ABREVIATURAS

AGEs.....	Productos finales de glicosilación avanzada (Advanced Glycation End-products)
AGER.....	Receptor de AGEs (Advanced Glycation End-products Receptor)
BMPs.....	Proteínas morfogénicas óseas (Bone morphogenetic proteins)
CTX / β -CrossLaps.....	Telopéptido carboxilo-terminal
CPO.....	Células precursoras osteogénicas
CPE.....	Células precursoras endoteliales
DM.....	Diabetes mellitus
DM1.....	Diabetes mellitus tipo 1
DM2.....	Diabetes mellitus tipo 2
DMO.....	Densidad mineral ósea
FA.....	Fosfatasa alcalina
GLUT1.....	Transportador de glucosa 1
HbA1c.....	Hemoglobina glicosilada
IGF-I.....	Factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (Type 1 insuline-like growth factor)
IGF-BP3.....	Insulin growth factor binding protein
IMC.....	Índice de masa corporal
MRO.....	Marcador de remodelado óseo
MSC.....	Mesenquimal stem cells
OB.....	Osteoblasto
OC.....	Osteoclasto
OCN.....	Osteocalcina
OCN+.....	Células que contienen osteocalcina
OPG.....	Osteoprotegerina
OPN.....	Osteopontina
OSC-fitc	Células positivas para osteocalcina detectadas con anticuerpo marcado con fluorescein isothiocyanate
P.....	Fósforo sérico
P1NP.....	Propéptido amino-terminal
PTH.....	Hormona Paratiroidea
rhPTH 1,34	Teriparatide
RANK.....	Receptor Activador del factor nuclear $\kappa\beta$
RANKL.....	Ligando del Receptor Activador del factor nuclear $\kappa\beta$
ROS.....	Especies oxígeno-reactivas (Reactive oxygen species)
SDF-1.....	Stromal cell derived factor 1
SOD2.....	Superoxido desmutasa 2
URO / CRO.....	Unidad de Remodelado Óseo / Compartimento de Remodelado Óseo