



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

Título tesis doctoral:

**INFLUENCIA GENÉTICA EN LA EVOLUCIÓN DE
LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA
EN PACIENTES AFECTAS DE
HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO**

Autor:

LIDIA GARCIA GIBERT

Director:

XAVIER NOGUÉS SOLAN

Tutor:

ADOLF DÍEZ PÉREZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

Trabajo de investigación presentado para optar

al título de Doctor

BARCELONA 2016

ÍNDICE

ÍNDICE:

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS	11
INTRODUCCIÓN	15
1. GLÁNDULAS PARATIROIDES	15
a. Anatomía e Histología	15
b. Fisiología	15
2. METABOLISMO OSTEO-MINERAL	16
a. Metabolismo fosfo-cálcico	16
b. Eje PTH-Vitamina D y otros factores reguladores	18
3. EL HUESO Y SU REMODELADO	22
a. Tipos de hueso	22
b. Composición del hueso	23
c. Remodelado óseo	25
d. Marcadores de remodelado	29
4. HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO	30
a. Manifestaciones clínicas	31
b. Diagnóstico	31
c. Criterios de tratamiento	32
5. OSTEOPOROSIS	34
a. Epidemiología y Factores de riesgo	34
b. Diagnóstico	31
c. Tratamiento	32
6. GENÉTICA Y HUESO	37
a. Inicios en el estudio genético de la osteoporosis	37
b. Genes candidatos relacionados con la osteoporosis	38
JUSTIFICACIÓN	43
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. DISEÑO	51
2. ÁMBITO	51

3. PACIENTES	51
a. Criterios de inclusión	51
b. Criterios de exclusión	51
c. Población a estudio	51
4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	52
a. Análisis de marcadores bioquímicos	52
b. Análisis a nivel hormonal	53
c. Análisis de marcadores de remodelado óseo	53
5. EVALUACIÓN DE LA MASA ÓSEA	53
a. Método de determinación de la densidad mineral ósea	53
b. Localización de la determinación de la densidad mineral ósea	53
c. Criterios densitométricos de normalidad y osteoporosis	53
6. ANÁLISIS GENÉTICO	54
a. Selección de genes candidatos y polimorfismos	54
b. Extracción de DNA	55
c. Genotipado de polimorfismos	56
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS	59
1. OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA, ANALÍTICA Y DENSITOMÉTRICA DE LAS PACIENTES CON HPTP PARA VALORAR LA POSIBLE RELACIÓN DE DIFERENTES VARIABLES CON LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA	
a. Características demográficas	59
b. Características analíticas y densitométricas en el momento del diagnóstico	59
c. Evolución de las variables analíticas y densitométricas tras intervención quirúrgica	61
d. Predictores demográficos, analíticos y densitométricos en la recuperación de la DMO tras PTx	62
2. OBJETIVO: GENOTIPAR LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS DE LOS GENES CANDIDATOS PARA VALORAR SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO, SU ASOCIACIÓN CON LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.	
a. Resultado del genotipado de los polimorfismos genéticos estudiados	65
b. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos	

estudiados y el hiperparatiroidismo primario	65
c. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico	67
d. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el cambio de DMO post paratiroidectomía	68
DISCUSIÓN	73
1. OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA, ANALÍTICA Y DENSITOMÉTRICA DE LAS PACIENTES CON HPTP PARA VALORAR LA POSIBLE RELACIÓN DE DIFERENTES VARIABLES CON LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PTx	
a. Características demográficas	73
b. Características analíticas y densitométricas en el momento del Diagnóstico	73
c. Evolución de las variables analíticas y densitométricas tras intervención quirúrgica	75
d. Predictores demográficos, analíticos y densitométricos en la recuperación de la DMO tras PTx	76
e. Limitaciones	79
2. OBJETIVO: GENOTIPAR LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS DE LOS GENES CANDIDATOS PARA VALORAR SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO, SU ASOCIACIÓN CON LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.	
a. Resultado del genotipado de los polimorfismos genéticos estudiados	81
b. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el hiperparatiroidismo primario	83
c. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico	84
d. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el cambio de DMO post paratiroidectomía	85
e. Limitaciones	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	93

ANEXOS

107

AGRADECIMIENTOS

119

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

1,25-OH₂ VitD	1,25-hidroxivitamina D o Calcitriol
1/3 PR	Tercio proximal del extremo distal del radio
25-OH VitD	25-hidroxivitamina D
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
Ca	Calcio sérico total
Ca_o	Calciuria en orina de 24 horas
CaSR	Receptor-sensor del calcio
CF	Cuello femoral
CL	Columna lumbar total
COL1A1	Cadena alfa 1 del colágeno tipo I
CT	Cadera total
CYP27B1	25-hidroxivitamina D 1-alfa hidroxilasa
DEXA	Densitometría por absorciometría dual fotónica
DMO	Densidad mineral ósea
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECaC	Canal epitelial del calcio
ESR1	Receptor estrogénico 1
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FGF-23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
GH	Hormona del crecimiento
GWAS	Estudios genómicos de asociación a gran escala
HapMap	Mapa de Haplotipos del genoma humano
HPTP	Hiperparatiroidismo primario
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a la insulina 1
IGF-BP	Proteína transportadora de los factores de crecimiento análogos a la insulina
IMC	Índice de masa corporal
INF-γ	Interferón γ
LRP5	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad tipo 5
LRP6	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad tipo 6
MAF	Frecuencia del alelo menor
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NS	No significativo
NTx	N-Telopéptido

OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
P	Fósforo sérico
P_o	Fosfaturia en orina de 24 horas
PGE2	Prostaglandina E2
PTH	Parathormona u hormona paratiroidea
PTHR	Receptor de la PTH
PTx	Paratiroidectomía
RANK	Receptor activador del factor nuclear KB
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear KB
RNA	Ácido Ribonucleico
Rx	Radiografía simple
RXR	Receptor X retinoide
SEIOMM	Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral
SNP	Polimorfismo de un cambio puntual de nucleótido
Tag-SNP	SNP que representa un haplotipo
TGF-β	Factor de crecimiento transformador β
THS	Tratamiento hormonal sustitutivo
UD	Zona ultradistal del radio
VDR	Receptor de la vitamina D
VDRE	Elemento de respuesta a la vitamina D
VFA	Morfometría vertebral
WHO	Organización mundial de la salud

INTRODUCCIÓN

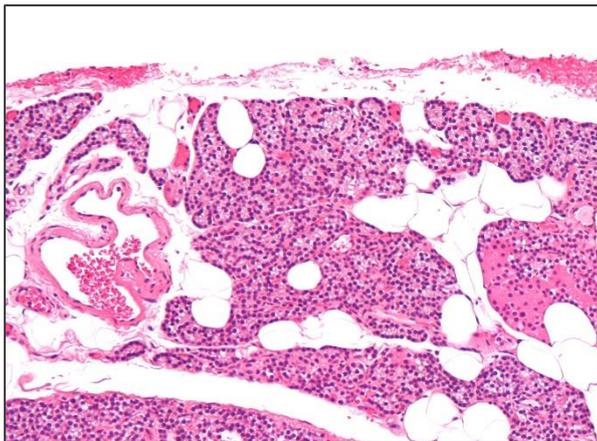
INTRODUCCIÓN:

1. GLÁNDULAS PARATIROIDES

1.a-. Anatomía e Histología:

Las glándulas paratiroides son unas estructuras pequeñas y ovoideas que, aunque su localización exacta es variable, suelen encontrarse en la parte posterior de la glándula tiroides. Embriológicamente proceden del tercer y cuarto arco branquial, por lo general son cuatro y se denominan en función de su localización en paratiroides superior/inferior y derecha/izquierda. Habitualmente tienen un tamaño de 5-6mm de longitud, por 4-5mm de ancho y 1.5-2mm de grosor, pesando unos 40 g cada una.

Histológicamente, cada glándula paratiroide está rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo y en su interior se encuentran tres tipos de células: las células principales, los adipocitos y las células oxífilas (Fig. 1). Las células principales son el componente activo de la glándula



paratiroide, ja que son las que producen la hormona paratiroidea (PTH). Los adipocitos hacen de tejido de sostén en el que las células principales y las oxífilas se disponen alrededor de una fina red de vasos capilares. La función exacta de las células oxífilas todavía no se conoce con certeza.

*Fig. 1: Histología de la glándula paratiroides
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Parathyroid_gland_low_mag.jpg)*

1.b. Fisiología:

La principal función de las glándulas paratiroides es la producción y secreción de la PTH. Esta hormona, junto con la vitamina D y la calcitonina, forman un complejo sistema endocrinológico que controla la homeostasis del calcio y del fósforo del organismo.

La PTH es un polipéptido de 84 aminoácidos cuyo residuo amino-terminal es la serina y el carboxi-terminal la glutamina (Fig. 2). Tiene una masa molar de 9.5 kD y su acción biológica radica en la secuencia 1-34.

Las células principales de las glándulas paratiroides disponen de un receptor-sensor del calcio que regula la síntesis, secreción y degradación de la PTH en función de las concentraciones plasmáticas del calcio. La disminución de la calcemia induce un aumento en la síntesis y secreción de la PTH, así como una reducción de su degradación.

Las acciones fisiológicas de la PTH son:

- A nivel renal: Produce un aumento en la reabsorción tubular de calcio y magnesio. También provoca un incremento en la excreción urinaria de fósforo por disminución de la reabsorción tubular proximal de este ion.
- En el hueso: La exposición continua a niveles elevados de PTH estimula la resorción ósea movilizando el calcio del hueso hacia el plasma.
- A nivel intestinal: Un exceso de PTH produce una sobreestimulación de la 1- α -hidroxilasa renal aumentando la metabolización de la 25-OH-Vitamina D hacia la 1,25-OH₂ vitamina D o calcitriol. Esta última estimula la absorción intestinal de calcio y fósforo.

Se ha observado que la actividad de la PTH está íntimamente relacionada con la presencia de calcitriol. En ausencia de esta vitamina la acción de la PTH es sustancialmente menor.

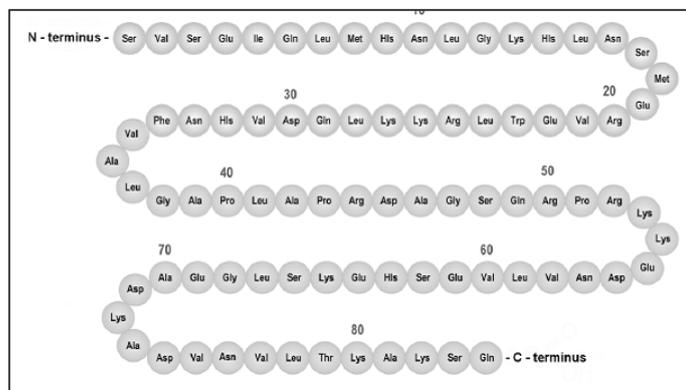


Fig. 2: Molécula de PTH (<http://www.rxlist.com/natpara-drug.htm>)

2. METABOLISMO OSTEO-MINERAL

2.a-. Metabolismo fosfo-cálcico:

El calcio y el fósforo son dos cationes de gran importancia en numerosos procesos biológicos. El calcio interviene en la conducción nerviosa, la contractilidad muscular, en la regulación de hormonas y enzimas, en la coagulación, la mineralización del hueso, etc. El fósforo forma parte de los fosfolípidos de membrana, de los nucleótidos que forman el RNA y el DNA, del metabolismo de moléculas como el ATP, actúa como regulador enzimático, etc.

Para mantener una calcemia y una fosfatemia que permita desarrollar todas estas funciones se dispone de un complejo sistema de regulación homeostática.

El 99% del calcio del organismo lo encontramos en forma de cristales de hidroxiapatita, es decir, en los huesos. El 1% restante se halla en el plasma y lo encontramos de tres maneras distintas: el 50% circula como catión libre, un 10% circula ligado a aniones como el citrato o el bicarbonato y el 40% lo hace ligado a proteínas (principalmente la albúmina).

El calcio iónico es la fracción biológicamente activa y puede sufrir variaciones importantes con el cambio de pH, ya que éste modifica la unión calcio-albúmina. Por cada décima que baja el

pH, la unión a proteínas baja un 0.2mg/dL, aumentando así el calcio iónico. Otro factor que puede interferir en la valoración del calcio plasmático es la concentración de proteínas. La calcemia aumenta o disminuye 0.8mg/dL por cada 1g/dL que varíe la albuminemia.

Del mismo modo que el calcio, la mayor parte del fósforo del organismo (el 85%) se encuentra en el hueso. El 70% del fósforo plasmático y la mayoría del fósforo intracelular se encuentra en forma de fosfato orgánico.

Absorción intestinal del calcio y del fósforo:

En condiciones normales sólo absorbemos el 30% del calcio que se encuentra en la dieta. Este calcio se absorbe fundamentalmente a nivel del duodeno y del yeyuno; y lo hace en su mayor parte, a través de un proceso de absorción transcelular que está regulado por la vitamina D. Las dietas pobres en calcio, el déficit de vitamina D y la falta de respuesta intestinal a la misma (tratamiento con corticoides, hipertiroidismo, síndromes de malabsorción...), son las causas más frecuentes del déficit de absorción del calcio.

El mecanismo de absorción del fósforo es similar al del calcio, aunque la absorción neta del mismo es proporcional al contenido en fósforo de la dieta. Esta absorción se ve entorpecida en dietas ricas en calcio, ya que se forman fosfatos de calcio que son prácticamente insolubles y siguen su curso por el intestino hasta ser excretados con las heces.

Reabsorción de calcio y fósforo a nivel renal:

Sólo el calcio plasmático que no está unido a proteínas plasmáticas es filtrado a nivel glomerular. El 70% del calcio ultrafiltrado se reabsorbe en el túbulo proximal, el 20% lo hace en el asa de Henle y un 8% en el túbulo contorneado distal. La PTH es el principal regulador de la excreción del calcio, ya que un aumento de esta hormona disminuye el filtrado y aumenta la reabsorción tubular del calcio. El calcitriol, por su acción en el túbulo distal, también provoca un aumento en la reabsorción del calcio.

Solo un 10% del fósforo plasmático circula unido a proteínas plasmáticas, esto implica que el 90% del fosfato es ultrafiltrable. A pesar de ello, más del 85% del fosfato filtrado a nivel glomerular será reabsorbido a nivel del túbulo proximal. La PTH también tiene un papel regulador en la eliminación renal de fosfato, ya que su aumento disminuye la reabsorción tubular, aumentando su eliminación.

Reabsorción del calcio y fósforo óseo:

La acción reabsortiva y movilizadora de calcio que tiene la PTH a nivel óseo viene determinada por el sistema OPG/RANK/RANKL. La PTH aumenta la expresión del RANKL y disminuye la de la OPG. Una vez unido a su receptor, el RANKL estimula la diferenciación de células precursoras a osteoclastos, activa los osteoclastos maduros y prolonga su vida al inhibir su apoptosis, aumentando, en definitiva, la resorción ósea.

La movilización del fósforo a nivel del hueso va en paralelo con la del calcio. A pesar de ello y dada la buena biodisponibilidad del fósforo de la dieta, el hueso no juega un papel de reserva biológica como pasa en el caso del calcio. El balance general de fosfatos se establece entre la ingesta y las pérdidas renales.

2.b-. Eje PTH-Vitamina D y otros factores reguladores:

La Parathormona:

La PTH y la forma activa de la Vitamina D (1,25-OH₂ VitD) son los principales elementos reguladores de la homeostasis del calcio. La PTH es sintetizada a nivel de las células principales de las glándulas paratiroides.

Los tres factores claves a nivel fisiológico en la síntesis y en la secreción de la PTH, así como en la proliferación de las células paratiroides, son el calcio extracelular, el fósforo y la 1,25-OH₂ VitD. En respuesta a una calcemia baja, un aumento del fosfato extracelular y/o una disminución de la 1,25-OH₂ VitD, las células principales de la glándula paratiroidea secretan y sintetizan más PTH a corto plazo, y sufren una proliferación celular a largo plazo.

La concentración extracelular de calcio es el determinante más importante en la secreción de PTH producida por la glándula paratiroidea. En el caso de producirse una hipocalcemia aguda, la PTH almacenada en vesículas excretoras de las células principales es secretada rápidamente mediante exocitosis en un breve espacio de tiempo (segundos o minutos). Para la corrección de hipocalcemia prolongadas, las células paratiroides reducen la degradación intracelular de la PTH en minutos u horas, aumentan la expresión genética de PTH (horas o días) y ponen en marcha mecanismos para aumentar la proliferación celular (de días a semanas). Todos estos procesos son mediados y controlados por el Receptor-sensor del calcio (CaSR) localizado principalmente en la superficie de las células paratiroides.

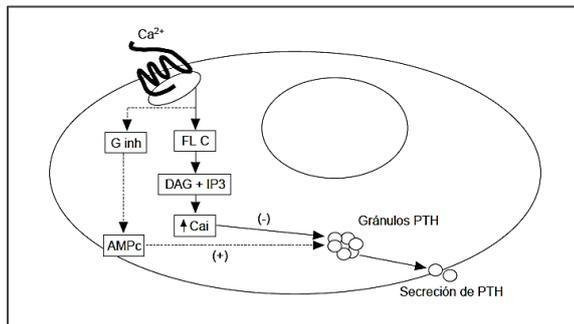


Fig 3: Activación del receptor sensor del calcio (<http://www.elsevier.es/es-revista-reemo-70-articulo-receptor-sensible-calcio-parathormona-13028843>)

El Receptor-sensor del calcio es un receptor transmembrana acoplado a la proteína G [Brown y col, 1995]. Este receptor tiene tres dominios: un dominio de “detección” situado a nivel extracelular, un dominio intramembrana de siete miembros llamado “serpenteante” y el dominio carboxiterminal. Después de la unión del calcio al dominio extracelular, el inicio de la señalización del CaSR requiere de la unión de las proteínas G a los bucles intracelulares del

receptor y a su porción terminal. Además de activar las fosfolipasas A₂, C y D, el CaSR también activa diferentes proteínas cinasas activadas por mitógenos e inhibe la adenilato ciclasa (Figura 3). Además de ser expresado en las células principales de la glándula paratiroidea, el CaSR también se localiza en las células C secretoras de calcitonina situadas en el tiroides [Brown y col, 2001].

La hiperfosfatemia provoca un aumento de la secreción de la PTH y un aumento de los niveles de RNA mensajero de la PTH a nivel intracelular [Slatopolsky y col, 1996]. En estos momentos se desconoce el mecanismo por el cual el fósforo produce estas variaciones en el metabolismo de la PTH.

La 1,25-OH₂ VitD produce una disminución en la secreción de PTH [Au WY, 1984], inhibe la expresión del gen de la PTH y limita la proliferación celular paratiroidea.

Las acciones biológicas de la PTH están mediadas por el receptor de la parathormona (PTHR) que pertenece a una familia específica de receptores acoplados con la proteína G. Si bien la mayoría de las acciones dependientes del PTHR requieren de la activación de la adenilato ciclasa, existen algunas que son mediadas por la fosfolipasa C. En presencia de factores reguladores del intercambio Na^+/H^+ el PTHR activa preferentemente la fosfolipasa C e inhibe la adenilato ciclasa a través de la estimulación de las proteínas G inhibitoras [Brown y col, 2006].

Este PTHR se encuentra en mayor medida en los órganos diana de la parathormona, es decir, en el riñón y el hueso. Sin embargo, también está presente en multitud de tejidos fetales y del individuo adulto, con una concentración especialmente elevada en los condrocitos de la placa epifisaria.

La PTH induce en el hueso una serie de reacciones complejas que requieren de la presencia de diferentes células especializadas, tales como los osteoblastos, los precursores hematopoyéticos, las células estromales y los osteoclastos maduros. La PTH estimula la expresión del RANKL en la superficie de los osteoblastos, las células del estroma y del sistema inmune e inhibe la producción de OPG (Figura 4). Una vez el RANKL se une a su receptor natural (RANK) a nivel del osteoclasto y sus precursores, se produce la diferenciación y la fusión de los pre-osteoclastos, se activan los osteoclastos maduros y se inicia la fase de resorción ósea. Es en ese momento cuando se produce una

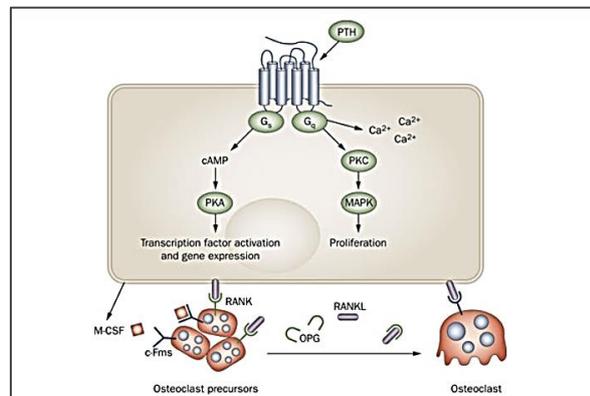


Figura 4: Activación del receptor de la PTH a nivel del hueso (http://www.nature.com/nrendo/journal/v7/n11/fig_tab/nrendo.2011.108_F1.html)

liberación de calcio, fósforo y otros componentes de la matriz (productos de degradación del colágeno) al torrente sanguíneo.

Sin embargo, la PTH administrada de forma intermitente tiene un efecto anabólico, sobre todo a nivel del hueso trabecular [Neer y col, 2001]. Los mecanismos por los que la PTH produce un aumento de la formación ósea todavía presentan muchos interrogantes [Silva y col, 2011]. La PTH induce un aumento del número de osteoblastos secundario a un incremento de las células osteoprogenitoras y a una disminución de su apoptosis [Jilka y col, 2009]. Así mismo, parece que tiene la capacidad de convertir las células de revestimiento en osteoblastos activos [Dobnig y col, 1995] y aumentar la producción de factores de crecimiento tales como el IGF-1 [Canalis y col, 1989].

A nivel renal, la PTH tiene tres funciones biológicas determinantes para la regulación de la homeostasis de los iones minerales: estimula la reabsorción del calcio, inhibe la reabsorción del fósforo y aumenta la síntesis de $1,25\text{-OH}_2$ Vit D al estimular la $1\text{-}\alpha$ -hidroxilasa renal.

La mayor parte de la reabsorción renal del calcio se produce a nivel del túbulo proximal, pero únicamente la que se produce a nivel del túbulo contorneado distal (8% del calcio ultrafiltrado) depende de la PTH. Aunque la reabsorción de calcio es más efectiva en presencia de PTH, en situaciones de aumento patológico de PTH se produce un aumento de la calciuria relacionado con la presencia de una hipercalcemia mantenida y por lo tanto, una mayor filtración del calcio sanguíneo.

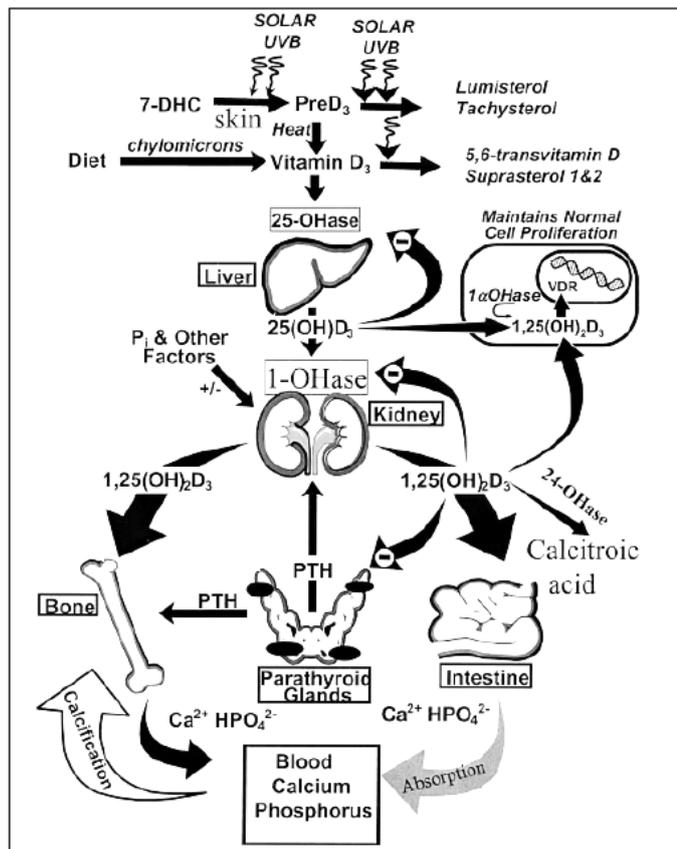
Otra de las funciones de la PTH es inhibir la reabsorción de fósforo a nivel renal. A nivel del túbulo contorneado proximal la bomba Na^+/K^+ ATPasa reabsorbe el sodio en contra del gradiente electroquímico y el sodio entra a la célula junto al fósforo, produciéndose también la reabsorción de este ion. El correcto funcionamiento de esta bomba requiere de la acción de dos cotransportadores sujetos a la membrana (NPT-2a y NTP-2c) que son bloqueados por la PTH, impidiendo así la reabsorción de fósforo a nivel renal y aumentando su eliminación.

Finalmente, la PTH estimula la 1- α -hidroxilasa renal a nivel del túbulo proximal produciendo un aumento de la degradación de la 25-OH VitD con la consecuente elevación de la 1,25-OH₂ Vit D. Este efecto no es inmediato ya que requiere de la síntesis de un nuevo RNA mensajero y de la proteína que codifica.

Estas funciones de la PTH a nivel renal también se encuentran reguladas, mediante el CaSR presente en las células renales, por el calcio extracelular. Los niveles elevados de calcio inhiben la 1- α -hidroxilasa renal independientemente de los niveles de fósforo o de PTH, aumentan la excreción de calcio, reducen la secreción de renina y disminuyen la capacidad del riñón de concentrar la orina [Sands y col, 1997]. Estas acciones antagónicas del calcio y la PTH establecen un mecanismo de autorregulación básico para mantener la homeostasis del organismo.

La Vitamina D:

La vitamina D₃ o colecalciferol se produce a nivel de la piel. Los rayos ultravioletas actúan sobre el 7-dehidrocolesterol rompiendo el anillo B y formando la pro-vitamina D₃. Esta pro-vitamina D₃ se isomeriza a vitamina D₃ y sale de la piel ligada a una proteína. Por lo tanto, si la



exposición a la luz solar es óptima no se necesitan suplementos de vitamina D.

Cuando el colecalciferol llega al hígado es metabolizado por una 25 hidroxilasa de la vitamina D del citocromo P-450 (CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1 y/o CYP2J3), que añade un grupo OH al carbono 25 de la vitamina D₃, dando lugar a la 25-OH Vit D [Holick MF, 2006]. Éste metabolito de la vitamina D tiene una vida media prolongada, es el metabolito circulante más abundante y el que se usa para valorar el estado nutricional de esta vitamina.

A partir de la 25-OH VitD y por acción de la 25-OH VitD

Figura 5: Metabolismo de la Vitamina D
(<http://ajcn.nutrition.org/content/79/3/362.full.pdf+html>)

1- α -hidroxilasa, se forma la 1,25-OH₂ VitD o calcitriol que es la forma más activa de la vitamina. Esta metabolización se produce principalmente a nivel de las células tubulares renales, aunque también se ha constatado en otras localizaciones [Holick MF, 2004]. La producción renal de la 1,25-OH₂ VitD está regulada por los niveles séricos de calcio, la PTH y el fósforo (Figura 5). Niveles bajos de calcio y/o fósforo, así como niveles elevados de PTH se correlacionan con concentraciones de 1,25-OH₂ VitD más elevadas.

La principal función biológica de la Vitamina D es mantener el calcio sérico en el rango de la normalidad. Este objetivo se consigue a través de dos vías: aumentando la eficiencia de la absorción intestinal de calcio y aumentando la actividad osteoclástica del hueso. Como en el caso del calcio y la PTH; los efectos de la Vitamina D están mediados por el receptor de la Vitamina D (VDR). Este receptor pertenece a una superfamilia de receptores nucleares de transcripción que son activados al unirse a un determinado ligando o factor. Al entrar en el núcleo celular, la 1,25-OH₂ VitD se asocia al VDR y se produce un cambio conformacional que favorece la unión de este complejo al Receptor X del ácido retinoico (RXR). El complejo

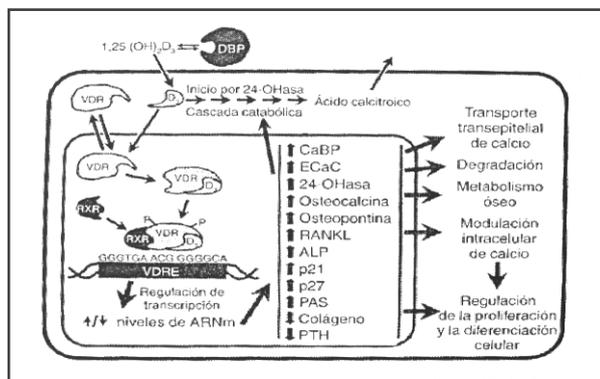


Figura 6: Mecanismo de acción de la 1,25-OH VitD y sus respuestas biológicas. Obtenido de: Holick MF, Garabedian M. Vitamina D: fotobiología, metabolismo, mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. En: Favus MJ (eds). Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Medical Trends. Barcelona. 2006; Pag 131-140

molecular formado por la 1,25-OH₂-VitD-VDR-RXR es el factor de transcripción funcionalmente activo en la transcripción mediada por la Vitamina D [Hausler y col, 1998; Sutton y col, 2003]. La formación de este último complejo promueve una cascada de interacciones macromoleculares que conduce, en último lugar, a la transcripción de los genes seleccionados (Figura 6).

La 1,25-OH₂ VitD aumenta la absorción intestinal del calcio al estimular la síntesis del canal epitelial del calcio (ECaC), la

proteína fijadora de calcio (calbindina D9K), la fosfatasa alcalina, la Ca-ATPasa de baja afinidad y la calmodulina entre otras. Todas ellas facilitan el movimiento del calcio a través del borde en cepillo de la célula intestinal y del citoplasma permitiendo el paso del calcio desde la luz intestinal al torrente sanguíneo [Christakos y col, 2003]. Cuando existe un aporte inadecuado de calcio en la dieta, la 1,25-OH₂ VitD interactúa con el VDR de los osteoblastos generando una cascada de señales bioquímicas que conducen a un incremento de la expresión del RANKL, lo que conduce finalmente un aumento de la resorción ósea.

Además de las clásicas acciones del calcitriol sobre la homeostasis del calcio-fósforo y del metabolismo mineral, se han descrito otras funciones a nivel del sistema inmune, en la maduración y diferenciación celular y en la regulación hormonal entre otras.

La Calcitonina:

La Calcitonina es un polipéptido compuesto de 32 aminoácidos, se produce a nivel de las células parafoliculares del tiroides y tiene una función hipocalcemiante.

Su principal acción biológica es la de inhibir la actividad osteoclástica [Deftos LJ, 2006]; de hecho, el osteoclasto es la célula con mayor concentración de receptores de calcitonina del

organismo. Esta inhibición del osteoclasto maduro y del reclutamiento de sus precursores produce una disminución del remodelado óseo, razón por la que se ha utilizado durante mucho tiempo como fármaco antiresortivo.

3. EL HUESO Y SU REMODELADO

El hueso es un tejido de sostén cuyas características más destacables son la dureza y la rigidez. Su función no sólo es mecánica, proporcionando una estructura de soporte que permite la locomoción y el movimiento del cuerpo, sino que también tiene una función protectora y una función metabólica, ya que tiene un papel importante en la homeostasis del calcio y del fósforo del organismo.

El esqueleto de un hombre adulto tiene un total de 213 huesos, con exclusión de los huesos sesamoideos [Clarke B, 2008]. Cada uno de estos huesos está sometido a un constante remodelado con dos objetivos primordiales. El primero es adaptarse a los posibles cambios en las fuerzas biomecánicas a las que son sometidos; el segundo es poder reparar daños estructurales cambiando el hueso viejo y/o dañado por un hueso nuevo.

3.a. Tipos de hueso:

Anatomía: Anatómicamente podemos clasificar los huesos en huesos largos, huesos cortos, huesos planos y huesos irregulares.

Los huesos largos son las clavículas, húmeros, radios, cúbitos, metacarpianos, fémures, tibias, peronés, metatarsianos y falanges. Estos huesos tienen tres partes bien diferenciadas: dos extremos anchos y aplanados llamados epífisis, un cilindro central llamado diáfisis y la zona de unión entre ambos que se llama metáfisis. Esta última se encuentra justo debajo de la placa de crecimiento.

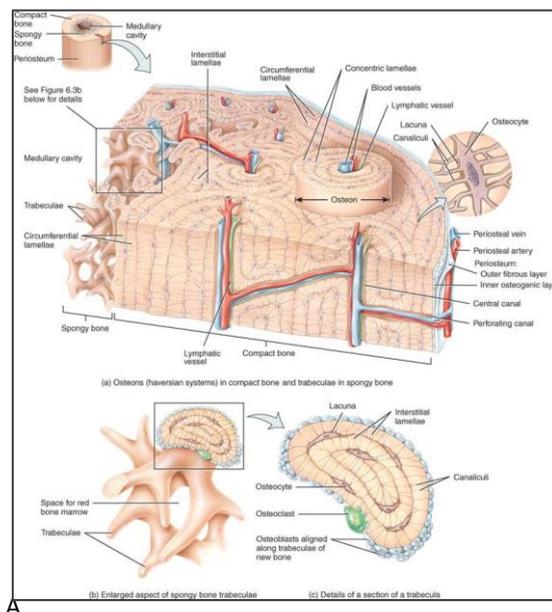
Los huesos cortos incluyen los huesos del carpo, del tarso, las rótulas y los huesos sesamoideos. Los huesos planos son los que forman el cráneo, la mandíbula, escápulas, esternón y costillas. Finalmente los huesos irregulares que incluyen las vértebras, el sacro, el coxis y el hioides.

Arquitectura: Los huesos tienen una estructura básica formada por una zona externa llamada hueso cortical y una zona interna llamada hueso trabecular o esponjoso.

El hueso cortical forma una corteza externa rígida y resistente a la deformación. Se encuentra en las diáfisis de los huesos largos y en la parte externa del resto de huesos del esqueleto. El hueso trabecular situado en el interior de los huesos forma una red de trabéculas que proporciona resistencia al hueso, ya que actúa como un complejo sistema de puntales internos. Los espacios existentes entre la red trabecular están ocupados por la médula ósea.

Aproximadamente el 80% del esqueleto adulto está compuesto por hueso cortical y el 20% es esponjoso, aunque la proporción relativa de ambos varía considerablemente entre los diferentes puntos del esqueleto. Por ejemplo, el porcentaje de hueso cortical es del 25% en las vértebras, del 50% en la cabeza del fémur y del 95% en la diáfisis de radio.

Histología: Los huesos tienen una vaina fibrosa externa llamada periostio y una superficie interna en contacto directo con la médula que se denomina endostio. El periostio es una capa de tejido conjuntivo fibroso que cubre toda la superficie ósea a excepción de las articulaciones que están cubiertas por cartílago. El periostio contiene vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, osteoblastos y osteoclastos. El endostio es también una vaina membranosa que recubre la cavidad de la médula, la superficie del hueso esponjoso y reviste los canales de los vasos sanguíneos que recorren el hueso. Como el periostio, también contiene osteoblastos y osteoclastos.



El hueso cortical tiene una red de conductos verticales, llamados conductos de Havers, que están unidos transversalmente por los conductos de Volkmann. Estos conductos contienen vasos sanguíneos y algunos nervios. Cada conducto de Havers está rodeado de capas concéntricas de hueso laminar. Estas capas contienen anillos de osteocitos dispuestos de forma concéntrica y que se comunican entre los osteocitos de su propia capa y de las capas adyacentes a través de proyecciones citoplasmáticas situadas dentro de canalículos estrechos (Fig. 7).

Fig. 7: Imagen de la estructura del hueso cortical y del esponjoso (http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch06/06_03.jpg)

El conducto de Havers, junto con sus capas de hueso concéntrico y el sistema de osteocitos, se lo denomina sistema de Havers u osteoma.

Los osteomas trabeculares tienen forma de platillo, con cerca de 3.5mm de grosor, y también están compuestos por haces de laminillas donde encontramos osteocitos.

3.b-. Composición del hueso:

El hueso es un tejido conectivo dinámico formado mayoritariamente por una matriz extracelular mineralizada y por células especializadas. Estas células son los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos.

Matriz extracelular: La matriz ósea está fisiológicamente mineralizada y es única porque se regenera de manera constante a lo largo de la vida. Esta regeneración es consecuencia del metabolismo óseo.

Los minerales comprenden el 50-70% del hueso, proporcionándole rigidez mecánica y resistencia para soportar cargas. Este mineral óseo está formado mayoritariamente por cristales de fosfato de calcio, es decir, por hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ y contiene numerosas impurezas como carbonatos, magnesio, otros fosfatos, fluoruros... Estos cristales imperfectos son extremadamente pequeños si se comparan con la hidroxiapatita geológica y

son mucho más solubles, lo que le permite al hueso actuar como reserva de iones de calcio y en menor medida de fósforo y magnesio.

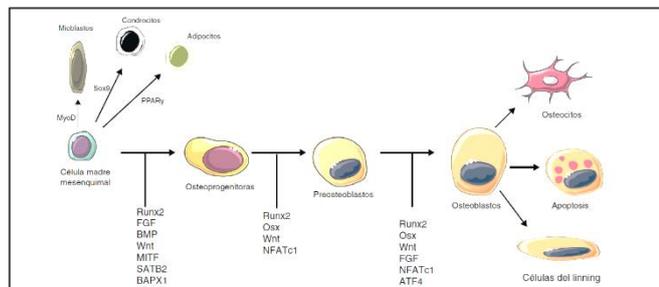
La matriz orgánica aporta el 20-40% del hueso y su compuesto principal es el colágeno tipo I. Esta proteína de triple hélice está formada por dos cadenas α -1 y una cadena α -2 que tiene una estructura similar a las otras aunque tiene un origen genético diferente. El colágeno tipo I funciona como un andamiaje, fijando y orientando otras proteínas así como la precipitación de la hidroxiapatita en el hueso. A parte del colágeno tipo I hay un 10-15% de otras proteínas que también componen la matriz orgánica y que también son sintetizadas y segregadas por las células formadoras de hueso. Estas proteínas no colagenosas son los proteoglicanos, las glucoproteínas, las proteínas N-glucosiladas con potencial para actividades de unión celular y las proteínas γ -carboxiladas.

El resto de matriz extracelular está formada por agua (5-10%) y lípidos (<3%).

Osteoblastos: Los osteoblastos se encuentran en el periostio y en el endostio, es decir, en las superficies óseas; y son los encargados de producir los diferentes componentes orgánicos de la matriz ósea. Al microscopio se presentan como células cúbicas o poligonales, con un citoplasma basófilo que traduce un retículo plasmático abundante y que pone de manifiesto su papel en la síntesis y secreción de proteínas.

Los osteoblastos derivan de células progenitoras mesenquimales presentes en la médula ósea y que pueden diferenciarse también hacia otras estirpes celulares como los adipocitos, fibroblastos, mioblastos y condrocitos [Arboleya y col, 2013]. Esta diferenciación viene determinada por la presencia de unos factores de transcripción concretos, así como de factores de crecimiento y/o hormonas específicas (Fig. 8).

Para la diferenciación hacia osteoblastos es imprescindible, ya en fases muy tempranas, la presencia del factor de transcripción Runx2. Este factor ya descrito a finales de siglo pasado es



necesario, pero no es suficiente. Otros factores determinantes para esta diferenciación son: el factor de transcripción Osx, el sistema de glucoproteínas Wnt, el factor de transcripción NFATc1, el factor de crecimiento FGF, las

Fig. 8: Diferenciación y activación osteoblástica (<http://www.reumatologiaclinica.org/es/osteoinmunologia-el-estudio-relacion-entre/articulo/S1699258X13000855/>)

t

eínas morfogénicas del hueso (BMPs), así como determinadas hormonas (PTH, Vitamina D, GH...), entre otros.

Durante esta diferenciación, el osteoblasto segrega una serie de proteínas que actúan como marcadores osteoblásticos; entre ellas destacan: el colágeno tipo I, la osteocalcina, la sialoproteína y la fosfatasa alcalina.

Osteoclastos: Los osteoclastos representan solo el 1-2% de las células óseas totales y como los osteoblastos, se sitúan en la superficie del hueso. Se trata de células grandes, multinucleadas y capaces de adherirse al hueso mediante un ribete en cepillo.

Los osteoclastos provienen de la estirpe monocítico-macrofágica y para su diferenciación es necesaria la presencia del factor estimulador de colonias (M-CSF) y del RANKL entre otros. El primero tiene un papel fundamental en la diferenciación a pre-osteoclastos y el segundo en la fusión de estos para generar el osteoclasto maduro (Fig. 9).

Cuando el osteoclasto maduro se activa, se generan cambios estructurales que favorecen la adhesión de la célula al hueso. Estos cambios generan compartimentos herméticos, que se acidifican mediante la acción de la anhidrasa carbónica, los canales de cloro y la bomba de protones H^+ -ATPasa.

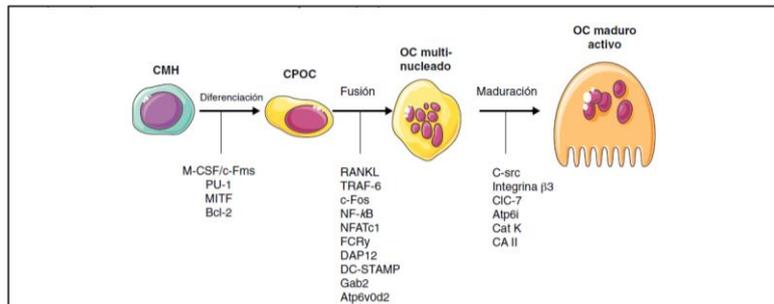


Fig. 9: Diferenciación osteoclástica

<http://www.reumatologiaclinica.org/es/osteoinmunologia-el-estudio-relacion-entre/articulo/S1699258X13000855/>

Este cambio de pH en la laguna osteoclástica provoca la disolución de la hidroxiapatita iniciándose el proceso de resorción ósea. Otras enzimas liberadas por el osteoclasto, como la

fosfatasa ácida tartrato resistente, la catepsina K, las metaloproteasas ... tienen como objetivo diluir la matriz y completar el proceso de resorción.

Osteocitos: Durante la formación ósea, algunos osteoblastos quedan englobados por la matriz que van produciendo y se diferencian a osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes de hueso (90-95%); probablemente esto se encuentra en relación a la larga vida que presentan, pues pueden alcanzar los 25 años.

Los osteocitos tienen una forma aplanada y fusiforme, con múltiples y largas prolongaciones que se extienden por los canalículos de la matriz y que sirven de unión con otros osteocitos cercanos, e incluso con los osteoblastos y/u osteoclastos de la superficie. Los osteocitos mantienen cierta actividad secretora, deducida de la gran cantidad de moléculas que se encuentran en los canalículos como el RANKL, la OPG, la PGE2, el óxido nítrico, el FGF-23...

Este entramado osteocito-radicular funciona como una red distribuida estratégicamente a lo largo del hueso, encargada de detectar cambios mecánicos o lesiones y capaz de atraer a la zona las células precisas para adaptar la forma del hueso o iniciar nuevas unidades de remodelado óseo.

3.c-. Remodelado óseo:

El proceso de remodelado óseo se produce en las llamadas "Unidades Básicas de Remodelado". Estas unidades están formadas por las células del hueso (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos), así como por tejido conectivo que proporciona el aporte vascular y nervioso a la zona. Todos estos componentes actúan de forma coordinada mediante una regulación compleja en la que intervienen factores mecánicos, hormonales, factores de crecimiento, etc.

Fases del remodelado óseo: El remodelado óseo se estructura en cuatro fases secuenciales bien definidas:

- Fase inicial o de activación: Las células de revestimiento se contraen y dejan al descubierto la zona del hueso dónde tendrá lugar el remodelado. En esta fase se produce un reclutamiento de los precursores de los osteoclastos, que migran y se fusionan los unos con los otros, para finalmente anclarse en la superficie ósea donde va a producirse la resorción.
- Fase resortiva: Los osteoclastos maduros y anclados ya en el hueso, inician el proceso de resorción mediante la acidificación del medio y la liberación de enzimas. A nivel de hueso trabecular se crean unas cavidades irregulares llamadas lagunas de Howship y a nivel de hueso cortical se generan una especie de túneles cilíndricos que son el resultado de esta resorción.
- Fase intermedia de reposo o inversión: Una vez finalizada la resorción, se produce la apoptosis de los osteoclastos. En las cavidades excavadas sobre el hueso aparecen los macrófagos, que tendrán una triple función: acabar de degradar la matriz restante, producir diferentes proteínas que servirán de anclaje entre el hueso nuevo y el viejo, y liberar diferentes factores de crecimiento que activarán los osteoblastos.
- Fase de formación y mineralización: Una vez los macrófagos han preparado estas cavidades, los osteoblastos se irán depositando sobre dicha superficie y empezarán a producir los componentes de la matriz extracelular que posteriormente se mineralizará.

Estas fases de remodelado son consecutivas, pero no simétricas ni de la misma duración. La vida media de los osteoclastos es de 2 semanas y la de los osteoblastos activos es de tres meses, eso determina que el periodo de resorción sea mucho más corto que el período de formación. En ausencia de enfermedad, estas diferencias de tiempo no provocan consecuencias estructurales relevantes.

En el esqueleto adulto sano hay entre 1.5 y 2 millones de unidades básicas de remodelado activas. Se calcula que cada año se renueva el 25-30% del hueso trabecular y el 3-5% del hueso cortical.

Regulación del remodelado óseo: El mecanismo de inicio, así como la regulación del remodelado óseo, tiene todavía muchos interrogantes. Se trata de una regulación compleja en la que participan diversos estímulos, algunos de los cuales afectan tanto a osteoclastos como a osteoblastos dificultando todavía más su interpretación. Algunos de los factores reguladores descritos en la literatura son [Reyes García y col, 2008; Neyro Bilbao y col, 2011]:

- Factores mecánicos: La falta de actividad física como factor de riesgo para el desarrollo de osteoporosis ya sugiere que los factores mecánicos pueden tener un papel importante en la regulación del remodelado óseo. El mecanismo por el cual el hueso es capaz de detectar diferentes estímulos físicos y convertirlos en señales biológicas y/o de expresión genética no se conoce en su totalidad, aunque parece que los osteocitos tienen un papel protagonista en este proceso.
- Factores hormonales: Un gran número de hormonas y no sólo las implicadas en la homeostasis del calcio, han sido relacionadas con el remodelado óseo.
 - o PTH: Los efectos de la PTH sobre el tejido óseo son complejos y en cierta manera contradictorios. Niveles elevados de PTH de forma continuada producen un

aumento de la actividad osteoclástica, sobre todo a nivel cortical. En cambio su administración intermitente produce una clara ganancia de masa ósea.

La PTH promueve la transformación de osteocitos en osteoblastos activos y provoca el aumento de su vida media al retrasar la apoptosis. Sin embargo, también induce la secreción de RANKL, IGF-1, IL-6 e IL-11, estimulando así la diferenciación osteoclástica.

- Calcitriol: La 1, 25-OH Vitamina D estimula de resorción ósea a través de su acción sobre los osteoclastos y sus células precursoras.
- Calcitonina: Es capaz de inhibir la acción de los osteoclastos.
- Estrógenos: La importancia de los estrógenos en el metabolismo óseo queda patente con la pérdida de masa ósea que se produce durante la menopausia. *In vitro*, los estrógenos inhiben la diferenciación de los osteoclastos y favorecen su apoptosis mediante un aumento de la secreción de TGF- β por parte de los osteoblastos. Así mismo, inhiben la producción de IL-6 que es uno de los principales estímulos de la resorción.

La deficiencia estrogénica incrementa la apoptosis de los osteocitos, lo que altera su función mecano-sensora. En dicha situación, también se produce un incremento de determinadas citoquinas proresortivas como la IL-1, M-CSF y el TNF- α .

Tanto *in vivo* como *in vitro*, los estrógenos estimulan la producción de OPG y suprimen la de RANKL.

- Hormona de crecimiento: La GH actúa sobre los osteoblastos incrementando su actividad, lo que produce un incremento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina.
 - Glucocorticoides: Fisiológicamente los corticoides actúan como moduladores del remodelado óseo. Sin embargo, administrados de forma exógena como tratamiento a diferentes patologías, provocan una disminución de la actividad osteoblástica y por lo tanto, inducen una osteoporosis secundaria.
 - Hormonas tiroideas: El hipertiroidismo representa un factor de riesgo para la presencia de osteoporosis, esto es debido a que las hormonas tiroideas estimulan los osteoclastos y aumentan el recambio óseo.
- Factores locales o paracrin: Las células óseas, las células de la médula ósea y algunas de las células sanguíneas como los monocitos y los macrófagos, son capaces de producir un gran número de sustancias que actúan de forma autocrina o paracrina modulando el remodelado óseo (Tabla 1).
- IGF-1 y IGF-BP: El IGF-1 estimula la osteoblastogénesis, la activación de los osteoblastos, la síntesis de las proteínas que formarán la matriz e inhibe, *in vitro*, la apoptosis de los osteoblastos. Las células óseas producen también seis tipos de proteínas transportadoras de IGF, aunque su función exacta tiene todavía muchos interrogantes. Parece que la IGF-BP4 tiene un papel inhibitor de la replicación y diferenciación de los osteoblastos, mientras que la IGF-BP5 sería un factor estimulador.

- Interleuquinas: La IL-1, IL-3, IL-6 estimulan la osteoclastogénesis en diferentes etapas de la diferenciación celular. La IL-12 y la IL-18 inhiben la formación de osteoclastos, mientras que la IL-4, IL-13 y la IL-10 inhiben su maduración. La IL-11 estimula la producción de RANKL por parte los osteoblastos.
- TGF-β: El TGF-β induce la apoptosis de los osteoclastos, hecho que inicia la fase de formación ósea. Así mismo, inhibe la apoptosis osteoblástica y estimula la síntesis de OPG.
- INF-γ: Inhibe la formación de osteoclastos y estimula la síntesis, entre otras, de IL-18.
- BMP: Las proteínas morfogénicas óseas son péptidos de la familia del TGF-β cuya acción principal es la estimulación de la osteoblastogénesis.
- Óxido nítrico: Es producido por los osteoblastos y las células endoteliales. Entre sus funciones destacan: inhibe los osteoclastos, interviene en el efecto anabólico de los estrógenos sobre el remodelado óseo, actúa como mediador entre los estímulos mecánicos y el hueso.
- Leptina: La leptina es una hormona liberada por los adipocitos y promueve la diferenciación osteoblástica, reduce su apoptosis y estimula la síntesis de proteínas de la matriz. Así mismo, disminuye la función osteoclástica por aumento de la OPG y descenso del RANKL.

		Estímulo de la resorción	Inhibición de la resorción	Aumento de la formación
Citoquinas				
Interleuquinas	IL-1	+		
	IL-4		+	
	IL-6	+		
	IL-11	+		
Factor de necrosis tumoral	TNF α	+		
Factor estimulante de colonias	GM-CSF M-CSF	+		
Interferón γ	IFN-γ		+	
Prostaglandinas	PGE	+		
Factores de crecimiento				
Tipo insulínico	IGF-I y II			+
Transformador	TGF-			+
Fibroblásticos	FGF	+		
Derivados de plaquetas	PDGF	+		
Proteínas morfogénicas óseas	BMPs			+
Leucotrienos		+		
Óxido nítrico	NO			+

Tabla 1: Principales factores locales reguladores del remodelado óseo (tabla obtenida de: Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Fil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. Rev Osteoporos Metab Miner. 2011. 3;2: 105-112)

- Sistema OPG/RANK/RANKL: Estas tres proteínas forman parte de la familia de los factores de necrosis tumoral.
 - El RANKL es una proteína transmembrana expresada en los osteoblastos, las células del estroma y del sistema inmune. Su producción es controlada por diferentes hormonas, citoquinas y factores de crecimiento; y varía en función del grado de madurez y de la diferenciación celular. Las células más jóvenes tienen una producción muy alta de RANKL y ésta va disminuyendo según madura la estirpe osteoblástica.
 - El RANK es el receptor natural del RANKL y se encuentra en la superficie celular de los osteoclastos y sus precursores. Una vez unido a su receptor, el RANKL estimula la diferenciación y fusión de los pre-osteoclastos, activa los osteoclastos maduros favoreciendo su adherencia al hueso, activa su función resorptiva y evita su apoptosis.

- La OPG es una proteína soluble que también actúa como receptor del RANKL. Este receptor señuelo es secretado, entre otras células, por los osteoblastos e impide la unión entre el RANK y el RANKL, inhibiendo así la diferenciación y activación de los osteoclastos.

	OPG	RANKL	RANK
Calcitriol	↑↓	↑	↑
Estrógenos	↑	↓ / —	
Testosterona	↑↓	—	
Glucocorticoides	↓	↑	
PTH	↓	↑	
IL1		↑	↑
IL4			↓ / —
IL7		↑	
IL-13	↑	↑	—
IL-17	↓	↑	—
TNF α		↑	
Interferón γ	↑	↑	↑
PGE ₂	↓	↑	
TGF β	↑	↑↓	—
BMP ₂	↑		—

↑ aumenta la expresión; ↓ disminuye la expresión;
— no se han observado cambios

El sistema OPG/RANK/RANKL se ha postulado como último efector de la mayoría de factores reguladores del remodelado óseo, ya que la gran mayoría de los factores descritos hasta ahora regulan la producción de la OPG y el RANKL (Tabla 2). Estas dos proteínas tienen efectos antagónicos y es la relación entre ambas lo que finalmente determinará el remodelado óseo.

Tabla 2: Reguladores de la expresión de OPG, RANKL y RANK (tabla obtenida de: Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Fil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. Rev Osteoporos Metab Miner. 2011. 3;2: 105-112)

3.d – Marcadores de remodelado:

Durante el proceso de remodelado óseo, los osteoblastos y los osteoclastos excretan una serie de enzimas y proteínas que les permiten llevar a cabo su función. Tanto en la fase de formación como en la de resorción, también se producen una serie de sustancias de degradación que serán vertidas al torrente sanguíneo. Algunas de estas enzimas, proteínas y productos de degradación son detectables a nivel analítico y su determinación nos permitirá valorar la actividad del remodelado. Son los llamados marcadores bioquímicos de remodelado óseo [Romero Barco y col, 2012].

Marcadores de formación:

- Fosfatasa alcalina: Aunque la fosfatasa alcalina se produce en múltiples tejidos, el 90% tiene su origen en el hígado y en el hueso. En ausencia de enfermedad hepática ambas se encuentran prácticamente en la misma proporción aunque en la actualidad ya puede detectarse en suero la isoforma ósea (FAO).
- Osteocalcina: La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular y en situaciones de aumento de remodelado óseo se encuentra elevada. Se

elimina a nivel renal, por lo que sus niveles también estarán elevados en pacientes con insuficiencia renal.

- Propéptido C-terminal y Propéptido N-terminal del protocógeno tipo I: El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular. A pesar de ello, y dada su gran presencia en otros tejidos, los propéptidos carboxi y amino terminales del protocógeno tipo I tienen un uso limitado en la práctica clínica.

Marcadores de resorción:

- Fosfatasa ácida tartrato resistente: Se trata de una enzima producida por los osteoclastos y que se encuentra involucrada en la resorción ósea. Tiene una baja especificidad ya que se encuentra también en otros tejidos.
- Telopéptido C-terminal y Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I: se trata de productos de degradación liberados durante el proceso de resorción ósea. Pueden determinarse tanto en sangre como en orina.
- Piridinolina y Deoxipiridinolina: Las moléculas de colágeno se enlazan entre sí mediante enlaces de piridinolinas y deoxipiridinolinas. Durante la resorción ósea estos enlaces son degradados y eliminados siendo posible su detección a nivel urinario.

4. HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

El hiperparatiroidismo primario es el tercer diagnóstico endocrinológico más frecuente y se caracteriza por una secreción excesiva, inadecuada y mal regulada de PTH, procedente de una o más glándulas paratiroides.

Como se ha descrito con anterioridad, la PTH actúa sobre el riñón, el hueso e indirectamente sobre el intestino, provocando un aumento de los niveles de calcio en plasma; pero en el caso del HPTP este aumento de la calcemia es incapaz de inhibir de forma correcta la secreción de PTH, ya que nos encontramos delante de una glándula enferma.

La inclusión de la calcemia en los análisis realizados de manera rutinaria ha hecho aumentar la incidencia de HPTP en los últimos años. Los registros de Rochester (Minnesota) mostraban una incidencia anual de 16 nuevos casos/100.000 habitantes antes de 1974 (época pre-screening) que aumentó hasta un pico de 112 nuevos casos/100.000 habitantes/año tras instaurarse la determinación de la calcemia como parámetro rutinario [Wermers y col, 2006; Griebeler y col, 2015]. De hecho, la causa etiológica más frecuente de hipercalcemia detectada de forma ambulatoria es el HPTP.

Aunque el HPTP puede diagnosticarse en cualquier etapa de la vida, su incidencia aumenta con la edad y es dos veces más frecuente en mujeres que en hombres. La forma de presentación más frecuente es el HPTP espontáneo, aunque un pequeño número de pacientes presentan una forma familiar/hereditaria o un HPTP asociado a un Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple.

Histológicamente, el HPTP puede estar producido por una hiperplasia glandular, un adenoma o un carcinoma de la glándula paratiroidea. La causa más frecuente de HPTP es la presencia de un adenoma paratiroideo único (80-90%); aunque se han descrito, en un pequeño porcentaje de casos, la presencia de dos o más adenomas. Hasta un 6% de los pacientes presentan una hiperplasia que habitualmente afecta a las 4 glándulas paratiroides; y sólo en un 1-2% de los pacientes, el HPTP tendrá su origen en un carcinoma paratiroideo.

4.a-. Manifestaciones clínicas:

Se reconocen tres fenotipos clínicos de HPTP: el HPTP sintomático, el HPTP asintomático y el HPTP normocalcémico [Silverberg y col, 2014].

HPTP asintomático: Actualmente, el 80% de los pacientes diagnosticados de HPTP se encuentran asintomáticos [Martínez Díaz-Guerra y col, 2013]. La determinación de la calcemia de forma rutinaria nos permite, ante pequeñas elevaciones del calcio sérico, sospechar dicha enfermedad antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas clásicas como la osteítis fibrosa quística y/o la litiasis renal.

En estos casos, la afectación ósea de la enfermedad se puede poner en evidencia mediante un estudio densitométrico y la afectación renal, mediante un estudio ecográfico y/o mediante la determinación de calcio urinario.

HPTP sintomático: El HPTP afecta principalmente a dos órganos: el riñón y el hueso. A la clínica producida por la afectación de estos órganos diana, tiene que añadirse la sintomatología asociada a la hipercalcemia.

La presencia de nefrolitiasis sigue siendo la manifestación clínica más frecuente del HPTP (20%). Otras manifestaciones renales son: la hipercalciuria, la nefrocalcinosis y la insuficiencia renal crónica.

La manifestación ósea clásica del HPTP es la osteítis fibrosa quística. Esta se caracteriza por la presencia de dolor óseo asociado a alteraciones radiográficas como: la reabsorción subperióstica a nivel de las falanges, imagen en “sal y pimienta” en la calota craneal, destrucción de la cortical en huesos largos y/o mandíbula secundaria a quistes óseos verdaderos o tumores pardos. Sin embargo, el hallazgo de anomalías radiográficas es actualmente excepcional (<2%) debido a que el diagnóstico de HPTP se produce de forma más temprana.

A la clínica ósea y renal, se añaden también diferentes manifestaciones cardiovasculares (HTA, hipertrofia ventricular izquierda, disfunción sistólica, rigidez vascular...), metabólicas (hiperlipidemia, alteraciones del metabolismo de la glucosa, hiperuricemia...), digestivas (anorexia, náuseas, pancreatitis, estreñimiento...) y neuropsiquiátricas (fatiga, debilidad, falta de concentración, depresión, ansiedad...).

HPTP normocalcémico: Esta forma de presentación fue reconocida formalmente en 2008, durante el tercer *workshop* internacional sobre HPTP [Bilezikian y col, 2009]. Se define como la presencia de concentraciones séricas de PTH elevadas en presencia de concentraciones repetidamente normales de calcio sérico, una vez descartadas todas las causas de HPT secundario. Sin embargo, la ausencia de hipercalcemia no presupone que estos pacientes se

encuentren asintomáticos [Martínez Díaz-Guerra y col, 2013]. Se ha descrito una incidencia similar de litiasis renal y osteoporosis entre estos pacientes y los afectados de un HPTP hipercalcémico [Lowe y col, 2007; Tuna y col, 2015].

4.b-. Diagnóstico:

El diagnóstico de HPTP se establece, habitualmente, ante la presencia de una hipercalcemia asociada a una PTH anormalmente elevada.

La determinación de la calcemia debe hacerse mediante un calcio iónico. Si esta determinación no es posible se aconseja su ajuste por albúmina mediante la fórmula: Calcio corregido = Calcio sérico en mg/dL + 0.8 x (4.0 - concentración de albúmina en g/dL).

En la actualidad se disponen de inmunoensayos de segunda y tercera generación para la determinación de PTH (Fig. 10). Ambas técnicas tienen una sensibilidad similar para el diagnóstico de HPTP y han demostrado su superioridad respecto a los ensayos de primera generación [Eastel y col, 2014]. Sin embargo, es importante ajustarse a los rangos de normalidad establecidos para cada técnica.

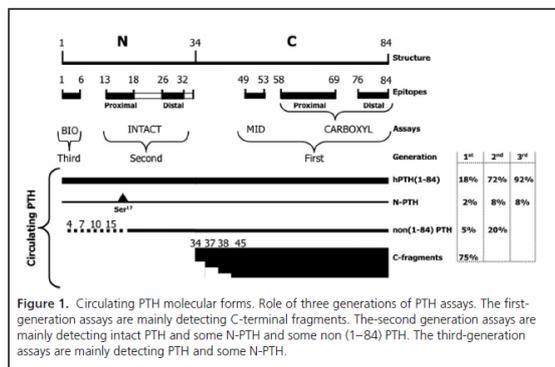


Figure 1. Circulating PTH molecular forms. Role of three generations of PTH assays. The first-generation assays are mainly detecting C-terminal fragments. The second-generation assays are mainly detecting intact PTH and some N-PTH and some non (1-84) PTH. The third-generation assays are mainly detecting PTH and some N-PTH.

rango de la normalidad puede considerarse anormalmente elevada en el contexto de una hipercalcemia periférica, ya que en dicha circunstancia la secreción de PTH debería estar suprimida. El 10-20% de los pacientes se hallan en esta situación.

En el HPTP hay un incremento en la metabolización de la 25-OH VitD por parte de la 1 α -hidroxilasa renal. Por lo tanto, es habitual encontrar concentraciones bajas de 25-OH VitD y concentraciones de 1,25-OH VitD por encima del rango de la normalidad. Sin embargo, un déficit de vitamina D puede producir un hiperparatiroidismo secundario. La determinación de los metabolitos de la vitamina D y su repleción, en caso de hipovitaminosis, es de vital importancia ante la sospecha de HPTP; ya que nos permitirá diferenciar entre un hiperparatiroidismo secundario y un HPTP normocalcémico.

Otros hallazgos de laboratorio típicos del HPTP son un fósforo en sangre en el rango normal-bajo y la presencia de hipercalciuria. Los marcadores de remodelado óseo pueden encontrarse elevados en los casos de HPTP con afectación ósea importante.

4.c-. Criterios de Tratamiento:

La indicación quirúrgica del HPTP sintomático está clara. Sin embargo, los criterios quirúrgicos de la forma asintomática han ido cambiando en los últimos años (Tabla 3). En la actualidad se recomienda el tratamiento quirúrgico si existe uno o más de los siguientes ítems [Bilezikian y col, 2014]:

El 80-90% de los pacientes con HPTP presentarán niveles elevados de PTH. Una determinación de PTH dentro del

Fig. 10: Formas de PTH que se encuentran en suero y su papel en el funcionamiento de los diferentes inmunoensayos. Obtenido de: Eastel R, Brandi ML, Costa AG, D'Amour P, Shoback DM, Rhakker RV. Diagnosis of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Proceedings of the Fourth International Workshop. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99(10): 3570-3579

- Calcemia superior a 1.0 mg/dL por encima del rango de la normalidad.
- Presencia de osteoporosis, definida como una T-score < 2.5, en cualquier localización estudiada mediante densitometría (columna lumbar, fémur y/o antebrazo).
- Presencia de fracturas vertebrales.
- Aclaramiento de Creatinina < 60cc/min y/o calciuria en orina/24h > 400mg/dL.
- Presencia de nefrolitiasis o nefrocalcinosis evidenciada por cualquier técnica de imagen (radiografía simple, ecografía, Tomografía Computarizada).
- Edad inferior a los 50 años.

Tabla 3: Cambios en las indicaciones quirúrgicas del HPTP según las guías internacionales				
	1990	2002	2008	2013
Calcemia por encima de la normalidad	1-1.6mg/dL (0.25-0.4mmol/L)	1.0mg/dL (0.25 mmol/L)	1.0mg/dL (0.25 mmol/L)	1.0mg/dL (0.25 mmol/L)
Afectación ósea	*DMO por DEXA: Z-score < -2.0	*DMO por DEXA: T-score < 2.5 en cualquier lugar	*DMO por DEXA: T-score < 2.5 en cualquier lugar *Fractura patológica previa	*DMO por DEXA: T-score < 2.5 en cualquier lugar *Fracturas vertebrales evidenciadas por Rx, TC o RNM
Afectación renal	*FG reducido en un 30% del esperado *Calciuria(24h) > 400mg/día (>10mmol/d)	*FG reducido en un 30% del esperado *Calciuria(24h) > 400mg/día (>10mmol/d)	*FG < 60cc/min	*FG < 60cc/min *Calciuria(24h) > 400mg/día (>10mmol/d) y riesgo incrementado de litiasis *Presencia de nefrolitiasis o nefrocalcinosis mediante Rx, Ecografía o TC
Edad	< 50 años	< 50 años	< 50 años	< 50 años

Tabla obtenida de: Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, Potts JT. Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99(10): 3561-3569

Teniendo en cuenta estos criterios quirúrgicos, a todo paciente con un HPTP debe de realizarse un estudio completo que incluya: análisis sanguíneo y de orina (con calcio, fósforo, creatinina, 25-OH VitD, PTH, calciuria/24h y aclaramiento de creatinina), densitometría ósea, radiografía de columna dorso-lumbar y ecografía abdominal.

Si el paciente cumple criterios de cirugía, la realización de una prueba de imagen (ecografía, TC cervical, gammagrafía Tc-mibi...) puede ser útil de cara a facilitar el abordaje quirúrgico.

Aquellos pacientes con un HPTP asintomático y que no cumplen criterios quirúrgicos deben ser controlados de forma periódica, ya que un tercio de estos pacientes presentarán una progresión sintomática de la enfermedad durante los 15 años siguientes al diagnóstico [Rubin y col, 2008]. Las guías sobre la monitorización de estos pacientes también han cambiado en los últimos años, siendo las últimas recomendaciones las que se describen a continuación [Bilezikian y col, 2014]:

- Determinación de calcio sérico, filtrado glomerular y creatinina sérica de forma anual.
- Realización de DEXA a nivel de columna lumbar, fémur y antebrazo cada 1 o 2 años. Así mismo, valorar la realización de Rx de columna dorso-lumbar o VFA mediante DEXA si clínicamente se sospecha fractura vertebral.
- Realización de perfil analítico de litiasis renal, Rx abdominal, ecografía y/o TC abdominal si se sospecha la presencia de litiasis renal.

La paratiroidectomía es el único tratamiento definitivo para el HPTP. Sin embargo, existen pacientes que rechazan la cirugía y otros en que, ya sea por riesgo quirúrgico o por comorbilidades, la PTx no es la primera opción terapéutica. En estos casos es necesario un abordaje médico y farmacológico de la enfermedad. A pesar de que los estudios publicados hasta el momento son escasos, el cuarto *workshop* internacional sobre HPTP propone un enfoque basado en tres pilares: la suplementación con calcio y vitamina D, los bisfosfonatos y el cinacalcet [Marcocci y col, 2014].

5. OSTEOPOROSIS

La conferencia de consenso del *National Institute of Health* del 2000, definió la osteoporosis como una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que aumenta el riesgo de fractura [NIH consensus, 2001]. La resistencia ósea viene determinada no sólo por la densidad del hueso, sino también por su calidad. Esta última depende de la microarquitectura del hueso, del recambio óseo, de la acumulación de microlesiones y de la mineralización del hueso.

5.a-. Epidemiología y factores de riesgo:

Epidemiología: La prevalencia de osteoporosis en nuestro medio es elevada y supone un alto gasto sanitario debido, sobre todo, a sus complicaciones. Su incidencia es mayor en mujeres y aumenta claramente con la edad.

Estudios epidemiológicos de la población femenina española muestran una prevalencia de osteoporosis a nivel de columna lumbar del 11,12% y del 4,29% a nivel del cuello femoral. Estos datos se incrementan de forma significativa a medida que aumenta la edad, llegando al 40,40% en CL y al 24,24% en CF cuando se superan los 70 años de edad [Díaz Curiel y col, 2001; Díaz Curiel y col, 1997]

Factores de riesgo: La osteoporosis es una enfermedad multifactorial que depende y se ve influenciada por diferentes factores genéticos, patológicos y ambientales [Kling y col, 2014]. Estos factores son:

- La edad: La incidencia de osteoporosis aumenta claramente a partir de los 50 años en las mujeres y a partir de los 70 en los hombres.
- El sexo: Es mucho más frecuente en mujeres que en hombres.
- La raza: Es más frecuente en la raza blanca y la asiática.
- IMC: Un índice de masa corporal bajo aumenta el riesgo de osteoporosis.

- Factores genéticos: Su incidencia es mayor en hijas de madres osteoporóticas.
- Factores hormonales como el tiempo de exposición a las hormonas sexuales (la incidencia de osteoporosis es mayor si la menopausia es precoz y/o la menarquía es tardía), el hipertiroidismo, el hiperparatiroidismo, el Síndrome de Cushing o la Diabetes Mellitus tipo 1.
- Factores higiénico-dietéticos: Dietas pobres en calcio, el tabaquismo, el sedentarismo o la ingesta excesiva de alcohol aumentan el riesgo de padecer osteoporosis.
- Fármacos: Hay una mayor incidencia de osteoporosis en pacientes que toman tratamiento crónico con corticoides.
- Factores patológicos: Enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la hemocromatosis, la celiaquía, la homocistinuria... se asocian a una disminución de la DMO.

5.b-. Diagnóstico:

El diagnóstico de osteoporosis se realiza en la mayoría de los casos por criterios densitométricos, aunque la presencia de una fractura por fragilidad nos permite establecer un diagnóstico clínico.

Criterios densitométricos: Desde hace años, para el diagnóstico densitométrico de la osteoporosis, se utilizan los criterios establecidos por la OMS en 1994 [WHO Study Group, 1994]. Estos criterios se establecieron para mujeres postmenopáusicas de raza blanca, por lo que su extrapolación a varones y mujeres jóvenes debe hacerse con cautela.

El diagnóstico de osteoporosis se establece ante valores de DMO inferiores a -2.5 desviaciones estándar respecto al pico de DMO juvenil (T-score).

Sin embargo, convertir una variable continua como la DMO en una variable dicotómica (presencia o no de osteoporosis), puede producir una falsa sensación de seguridad respecto a la presencia o no de riesgo de fractura. Por este motivo se creó el concepto de osteopenia, definida como una DMO que se encuentra entre -2.5 y -1.0 desviaciones estándar respecto al pico juvenil.

Criterios clínicos: La presencia de una fractura osteoporótica o por fragilidad es el estadio establecido de la enfermedad osteoporótica. Sin embargo, la dificultad para utilizar este criterio radica en poder asegurar, sin realizar otras exploraciones complementarias, que se trata de una fractura osteoporótica. Hay una serie de factores que apoyan esta etiología:

- Ausencia de otro factor que justifique la fractura: ausencia de traumatismo, otra enfermedad ósea...
- Presencia de factores de riesgo para padecer osteoporosis: edad, sexo, tratamiento corticoideo...
- Localización típica de la fractura osteoporótica: fémur proximal, columna vertebral (por debajo de T4) y antebrazo distal.

5.c-. Tratamiento:

Indicación de tratamiento: La Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral establece las siguientes indicaciones para el inicio del tratamiento [González-Macías y col, 2015]:

- Pacientes que presenten osteoporosis que ya halla sido diagnosticada por criterios clínicos (fractura por fragilidad) o por criterios densitométricos (DMO igual o inferior a 2,5 T en columna lumbar, cuello femoral o cadera total).
- Aquellos pacientes que tienen un riesgo de sufrir fractura lo suficientemente importante como para que justifique tanto el coste del tratamiento como el riesgo de padecer los efectos adversos de éste. En concreto cabe mencionar dos situaciones:
 - o Utilización de corticoides. La administración de glucocorticoides a una dosis mínima de 5mg/día durante tres meses, es por sí sola, indicación de tratamiento para prevenir una osteoporosis secundaria.
 - o Asociación de valores densitométricos superiores al umbral de osteoporosis pero próximos a él ($T \leq -2,0$) con la presencia de otros factores de riesgo para fractura (edad > 65 años, IMC < 19, antecedente familiar de fractura, asociación de tabaquismo y alcoholismo severos, diabetes, artritis reumatoide...).

Medidas no farmacológicas: Como medidas generales debe recomendarse a toda la población, y en particular a los pacientes osteoporóticos, la práctica de ejercicio físico, la eliminación de hábitos tóxicos, una dieta equilibrada con aporte adecuado de calcio y vitamina D, así como la puesta en marcha de medidas para la prevención de caídas.

Tratamiento farmacológico: El objetivo del tratamiento de la osteoporosis es reducir el riesgo de fractura. En el momento actual existen tres categorías de fármacos antiosteoporóticos: los antirresortivos, los anabólicos y los agentes de doble acción [Pérez-Edo y col, 2011].

- Fármacos antirresortivos o anticatabólicos: inhiben la resorción ósea al actuar sobre los osteoclastos y/o sus precursores, disminuyen el remodelado óseo, incrementan la densidad mineral ósea y preservan la microarquitectura del hueso.
 - o Tratamiento hormonal sustitutivo: Actualmente solo se utiliza el THS en mujeres con menopausia precoz, con intensa sintomatología climatérica o en el caso de no poderse administrar otros fármacos para la osteoporosis.
 - o Calcitonina: La Agencia Europea del Medicamento alertó en 2012 que su uso prolongado se asocia a un mayor riesgo de desarrollar cáncer, por lo que aconsejan tratamientos cortos y en la forma inyectable (no intranasal). Hasta ese momento estaba indicada en el tratamiento de fracturas vertebrales recientes y sintomáticas por el efecto analgésico que tiene.
 - o Raloxifeno: Forma parte, junto con el bazedoxifeno, de los Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs). Son fármacos de segunda línea en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Disminuye la pérdida de DMO y reduce el riesgo de fracturas vertebrales.
 - o Bisfosfonatos: Son los fármacos de primera línea en el tratamiento de la osteoporosis y por lo tanto, los más utilizados en la actualidad. Su eficacia ha sido ampliamente demostrada y aunque en general son bien tolerados, la adherencia al tratamiento resulta relativamente baja a largo plazo. Los bisfosfonatos comercializados en la actualidad son: Etidronato, Alendronato, Risedronato, Ibandronato y Zolendronato.
 - o Denosumab: Se trata de un anticuerpo monoclonal específico que bloquea el RANKL, por lo que inhibe la formación, la activación y la supervivencia de los

osteoclastos; disminuyendo así la resorción ósea. Está autorizado para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica con alto riesgo de fractura.

- Fármacos anabólicos: actúan sobre los osteoblastos o sus precursores, producen un incremento del remodelado óseo (mayor incremento de la formación de hueso que de la resorción) y aumentan la masa ósea. En la actualidad existe sólo un análogo de la PTH comercializado: la teriparatida o rhPTH 1-34 usada a dosis de 20µg/día por vía subcutánea. La rhPTH 1-84 a dosis de 100µg/día por vía subcutánea dejó de comercializarse por causas no conocidas. Existe limitación de dos años en la duración del tratamiento por temas de seguridad.
- Fármacos de acción mixta: El ranelato de estroncio produce un aumento de la formación y una disminución de la resorción ósea, que se traduce en un incremento real de la masa y resistencia ósea. Está indicado en la osteoporosis postmenopáusica para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en subgrupos de alto riesgo que no puedan usar otras alternativas terapéuticas. No se recomienda su uso en pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica, vasculopatía periférica, patología cerebrovascular e hipertensión arterial mal controlada.

La elección del fármaco dependerá de múltiples factores tales como: el riesgo de fractura vertebral y/o no vertebral, los valores de DMO, los antecedentes patológicos de la paciente, etc. En la Fig. 11 se describe el algoritmo de elección del fármaco recomendado por la SEIOMM.

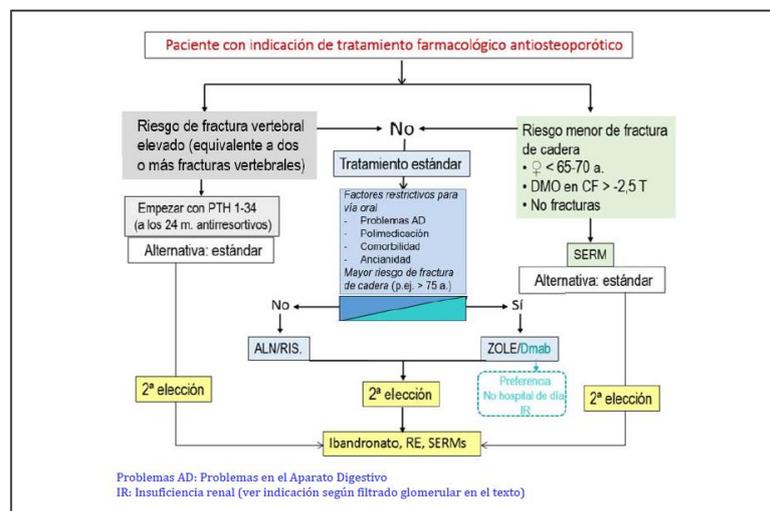


Fig. 11: Algoritmo de elección del fármaco para el tratamiento de la osteoporosis. <http://www.seiommm.org/documento/vista-previa/guia-seiommm-2014-actualizada-abril-2015>

6. GENÉTICA Y HUESO

6.a-. Inicios en el estudio genético de la osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad multifactorial en la que están involucrados diferentes factores genéticos y ambientales; algunos de los cuales se han comentado ya con anterioridad.

Existen múltiples estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto este componente genético, tanto por lo que respecta a la DMO [Smith y col, 1973; Pocock y col, 1987; Evans y col, 1988; Seeman y col, 1989] como al riesgo de fractura [Cummings y col, 1995]. Los estudios

realizados por Smith en una cohorte de gemelos demostraron, hace más de 40 años, que la DMO tenía mayor heredabilidad en los gemelos monocigotos que en los dicigotos [Smith y col, 1973]. Así mismo, el trabajo de Cummings puso de manifiesto que el riesgo de padecer una fractura de cadera se duplicaba si existían antecedentes maternos de fractura [Cummings y col, 1995].

Sin embargo, al tratarse de una enfermedad compleja, la osteoporosis no sigue un patrón de herencia mendeliano simple. Los factores de riesgo genéticos son transmitidos de generación en generación, pero su expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes y/o con factores ambientales.

Con el objetivo de identificar y caracterizar los genes implicados en una enfermedad compleja, como la osteoporosis, se realizan estudios de ligamento y/o de asociación.

En la población existen múltiples variantes genéticas llamadas polimorfismos, la mayoría de las cuales son cambios de un solo nucleótido (SNP). Se calcula que en el genoma humano hay unos 10 millones de SNPs con frecuencias del alelo minoritario superiores al 10%. Los marcadores genéticos analizados en los estudios de asociación suelen ser polimorfismos de un cambio puntual de nucleótido.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de asociación a gran escala (GWAS) que han identificado más de 60 genes relacionados con la DMO y más de 20 asociados con el riesgo de fractura [Liu y col, 2014; Richards y col, 2012]. En estos estudios se genotipan cientos de SNPs con la finalidad de encontrar una asociación con los fenotipos de la enfermedad estudiada. Sin embargo, esta asociación no aporta información sobre el funcionalismo de los polimorfismos estudiados, su relación con otros genes o la posible interacción con factores ambientales.

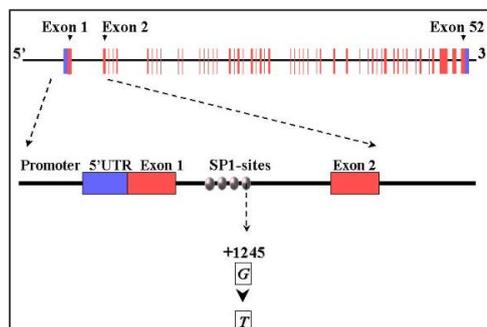
Los genes clásicamente relacionados con la osteoporosis han sido el gen *COL1A1*, el gen *ESR1*, el gen *VDR* y el gen *TGF-β*. Sin embargo, en los últimos años han aparecido estudios con otros genes candidatos como el gen *LRP5*, el gen *LRP6*, el gen *WNT16*, el gen *TNFRSF11A* (también conocido como RANK), el gen *TNFSF11* (también llamado RANKL) o el gen *TNFRSF11B* (también denominado OPG), entre otros.

6.b -. Genes candidatos relacionados con la osteoporosis:

Gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (*COL1A1*):

El gen *COL1A1* está localizado en el cromosoma 17, en la región 17q21.31-q22.15, y contiene la información necesaria para la síntesis de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I. Esta proteína se encuentra presente en el hueso (es el principal componente de la matriz extracelular), en la piel, tendones, ligamentos y otros tejidos de sostén.

El polimorfismo más estudiado de este gen es el rs1800012 (también llamado Sp1). Se trata de



la sustitución de una guanina por una timina en el primer intrón del gen (Fig. 12). Ya en 1996, Grant objetivó que las pacientes homocigotas G/G tenían una DMO significativamente mayor que las pacientes heterocigotas G/T y homocigotas T/T, con un riesgo relativo de 2.97 (IC 95% 1.63-9.56) de padecer una fractura

vertebral para las portadoras de una timina [Grant y col, 1996].

Fig 12: Gen del COL1A1
<http://www.genomos.eu/index.php?page=history>

Gen del Receptor Estrogénico Tipo 1:

El gen ESR1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q25.1). Este receptor se expresa, a nivel de hueso, en osteoblastos, osteoclastos y las células estromales de la médula ósea.

Los dos polimorfismos más estudiados son el rs223493 o XbaI (que sustituye una adenina por una guanina) y el rs9340799 o PvuII (que sustituye una timina por una citosina).

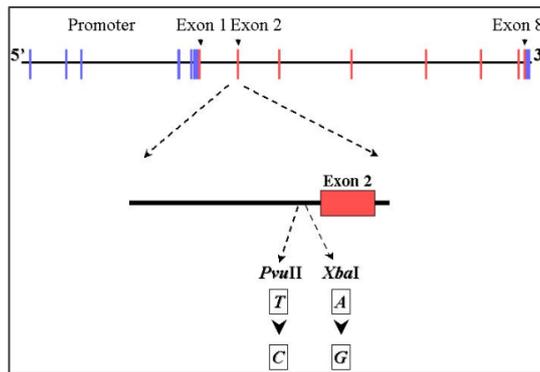


Fig.13: Gen del receptor estrogénico tipo 1
<http://www.genomos.eu/index.php?page=history>

Ioannidis demostró, en 2004, que ser portador homocigoto G/G para el polimorfismo XbaI tenía un efecto protector para la fractura osteoporótica. Sin embargo, este polimorfismo no se asoció con la DMO. La Odds Ratio para el riesgo de fractura total disminuía un 20% y para el riesgo de fractura vertebral lo hacía en un 30% en los pacientes

homocigotos [Ioannidis y col, 2004].

Gen del Receptor de la Vitamina D:

El gen del receptor de la Vitamina D se localiza en el cromosoma 12 (región 12q12-q14), y a día de hoy, es probablemente el gen relacionado con la osteoporosis más estudiado. Los polimorfismos rs1544410 (Bsm I) y rs7975232 (Apa I), localizados en el intrón 8, y el polimorfismo rs731236 (Taq I), localizado en el exón 9, son polimorfismos de restricción. El polimorfismo rs11568820 (Cdx 2) se encuentra en un área promotora del gen VDR y el polimorfismo rs2228570 (Fok I) es el único que se encuentra en la región codificante (la variante alélica f da lugar a una proteína de 427 aminoácidos mientras que la variante alélica F da lugar a una proteína con tres aminoácidos menos).

El estudio más completo sobre el gen del receptor de la Vitamina D fue publicado por Fang en 2005. Se trata del Estudio Rotterdam, dónde se analizaron 15 haplotipos que se distribuían por 5 regiones claves del gen del VDR (Fig. 14). Los haplotipos de la región 5' 1a/1e, de la región promotora 1b y de la región 3' (dónde se incluyen los polimorfismos BsmI, ApaI y TaqI), se relacionaron con el riesgo de fractura. Los pacientes con haplotipos de riesgo en dos o tres de estas localizaciones tenían un incremento del riesgo de fractura de hasta un 48% independientemente de la edad, sexo, IMC y/o DMO. Sin embargo, los haplotipos de riesgo

p

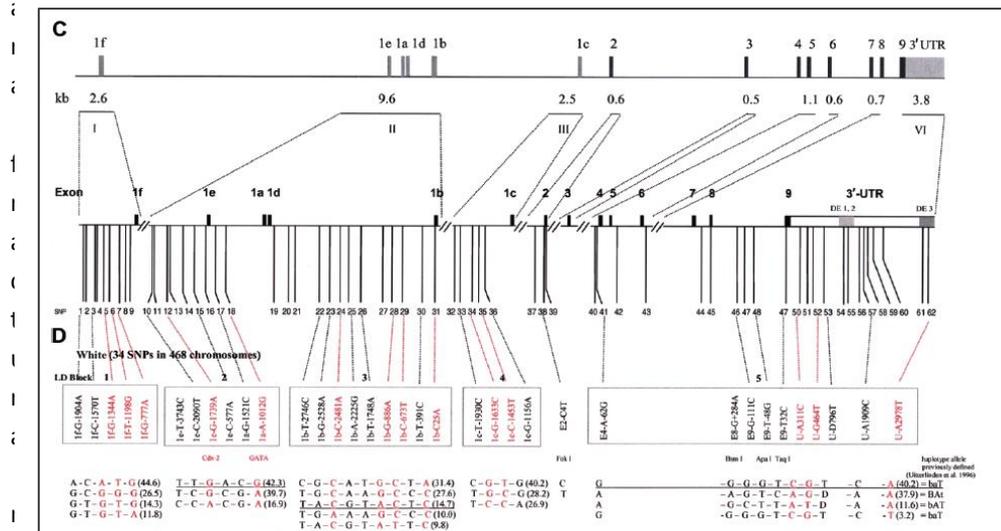


Fig. 14: Gen del receptor de la vitamina D y haplotipos de riesgo detectados en el Estudio Rotterdam. Figura obtenida de: Fang Y, van Meurs JBJ, d'Alesio A, JZhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JPT, Jehan F, Pols HAP, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-Untranslated-Region Haplotypes in the Vitamin D Receptor Gene Predispose to Osteoporotic Fracture: The Rotterdam Study. Am J Hum Genet. 2005; 77: 807-823

C

asociaron con la DMO [Fang y col, 2005].

Los estudios funcionales realizados en dicho trabajo mostraron que los haplotipos de riesgo en la región promotora se asociaban a una menor expresión del gen VDR y que los haplotipos de riesgo de la región 3' se asociaban a un incremento en la degradación del RNA mensajero.

Gen del Factor de Crecimiento Transformador β :

El gen del Factor de Crecimiento Transformador β (TGF- β) se encuentra en el cromosoma 19(19q13.1). El TGF- β está presente en la matriz ósea y es uno de los reguladores de la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos, por lo que interviene de forma directa en la formación de hueso.

Son muchos los polimorfismos del gen del TGF- β estudiados. Langdahl y colaboradores, relacionaron en 2003 el polimorfismo T(816-20)-C, el C(-1348)-T y el T(29)-C con la DMO y la presencia de fracturas. Los homocigotos T/T para el polimorfismo T(816-20)-C tenían una DMO más alta en columna lumbar, cuello femoral y cadera total; así como, menor frecuencia de fracturas osteoporóticas. Los homocigotos T/T para el polimorfismo C(-1348)-T tenían mayor DMO a nivel de cuello femoral comparado con los genotipos T/C o C/C. Los homocigotos C/C para el polimorfismo T(29)-C tenían una DMO más alta en cuello femoral y cadera total que los genotipos C/T o T/T [Langdahl y col, 2003].

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN:

El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es el tercer diagnóstico endocrinológico más frecuente y afecta a un 0,3% de la población general, pero su prevalencia aumenta hasta un 1-3% si hablamos de mujeres postmenopáusicas [Adami y col, 2002; Wermers y col, 2006; Mihai y col, 2008, Bandeira y col, 2009]. Así mismo, la osteoporosis es una enfermedad que alcanza una prevalencia del 20-25% en este segmento de población [Díaz-Curiel y col, 2001; Brown y col, 2002]. Estas dos entidades producen alteraciones a nivel del metabolismo calcio-fósforo, pero la relación entre ambas no se encuentra todavía bien definida. Por ejemplo, la parathormona (PTH) tiene un efecto paradójico sobre el hueso. Puede causar pérdida de masa ósea en infusión continua y por el contrario puede aumentar la masa ósea cuando se administra de forma intermitente [Neer y col, 2001].

Habitualmente, el HPTP está causado por un adenoma benigno de una de las glándulas paratiroides. En los últimos años se han revisado los criterios quirúrgicos del hiperparatiroidismo primario [Bilezikian y col, 2009; Bilezikian y col, 2014] y la presencia de osteoporosis en cualquier localización forma parte de ellos. Sin embargo, la respuesta tras la paratiroidectomía (PTx), en cuanto a la recuperación de la masa ósea, no se produce de forma generalizada en todos los casos.

Los datos de los que se disponen en la actualidad, provienen de estudios con muestras de población pequeñas y muy heterogéneas, cosa que dificulta la interpretación de los mismos. El meta-análisis realizado por Sankaran en 2010, concluyó que la cirugía tiene un efecto beneficioso sobre la recuperación de la masa ósea [Sankaran y col, 2010]. Sin embargo, el trabajo realizado por Sitges-Serra en 2010, evidenció que sólo el 46% de las pacientes sometidas a una PTx mostraban un aumento significativo de la densidad mineral ósea (DMO) a nivel de cuello femoral. En este caso se analizó de forma individual dicha evolución, objetivando que eran las pacientes más jóvenes y las que presentaban un HPTP más severo las que presentaban una mayor recuperación de la DMO tras la cirugía [Sitges-Serra y col, 2010]. A pesar de estos resultados, es más que probable que hallan otros factores que influyan en dicha recuperación.

Actualmente se disponen de claras evidencias de que la DMO y la variación en el remodelado óseo están genéticamente determinadas. Entorno a un 75-80% en la variación de la masa ósea producida con la edad está condicionada por factores genéticos [Smith y col, 1973; Pocock y col, 1987; Evans y col, 1988; Seeman y col, 1989].

Hay poca bibliografía sobre la relación entre genética e hiperparatiroidismo. De los muchos genes potencialmente relacionables con el HPTP, el más estudiado es el gen del receptor de la Vitamina D (VDR). Carling y colaboradores, realizaron varios estudios entre 1995 y el 1997 en los que estudiaron la prevalencia de los diferentes polimorfismos del gen del VDR (Bsm1, Apa1, Taq1) y evidenciaron un mayor porcentaje de los alelos baT en los pacientes afectados de HPTP [Carling y col, 1995; Carling, Kindmark y col, 1997] e incluso demostraron que este haplotipo se relacionaba con un aumento de la concentración de calcio requerida para inhibir la secreción de PTH [Carling, Ridefelt y col, 1997]. Sin embargo, otros estudios no han demostrado diferencias significativas en los porcentajes de estos alelos con respecto a la población control [Menárguez y col, 1999; Pacheco y col, 2000; Sosa y col, 2000].

Solo dos estudios han relacionado diferentes polimorfismos del gen del VDR con la DMO en pacientes con HPTP. Kobayashi estudió en 1998 el polimorfismo Bsm1 y observó que los pacientes con el genotipo

bb tenían una menor DMO a nivel de radio que los pacientes BB/Bb [Kobayashi y col, 1998]. Unos años después; Christensen objetivó que aquellos pacientes con el genotipo AA o CA para el polimorfismo Apa1, tenían una menor DMO a nivel de columna lumbar en comparación con los que tenían el genotipo CC [Christesen y col, 2013].

En los últimos años, la investigación se ha centrado en el gen del receptor-sensor del Calcio (CaSR), del que se han estudiado tres polimorfismos (A986S, R990G, Q1011E). A pesar de los múltiples estudios que han relacionado el polimorfismo R990G con la presencia de litiasis renal [Corbetta y col, 2006; Scillitani y col, 2007; Vezzoli y col, 2015], sólo el trabajo de Han asoció el genotipo RR+GR con una menor DMO a nivel de columna lumbar [Han y col, 2013].

Revisada la bibliografía de la que se dispone en la actualidad, parece bastante claro que deben seguirse realizando nuevos estudios con polimorfismos candidatos que tengan mayor sentido funcional. Conocer mejor estos polimorfismos, su relación con la DMO y su influencia sobre la evolución de la enfermedad, nos permitiría identificar las pacientes de mayor riesgo y predecir la respuesta al tratamiento; es decir, nos permitiría mejorar la atención a las personas que padecen un HPTP.

La detección precoz de las pacientes cuya DMO no mejorará tras la PTx, nos permitiría iniciar antes el tratamiento farmacológico y por lo tanto, reducir de forma más rápida el riesgo de fractura.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La evolución de la masa ósea tras PTx en pacientes con HPTP está relacionada con diversos factores demográficos, clínicos y/o analíticos.

Existen diversos polimorfismos de genes candidatos relacionados con el metabolismo osteo-mineral que influyen en el cambio de DMO que se produce tras la cirugía, por lo que la evolución de la masa ósea tras PTx también está determinada genéticamente.

OBJETIVOS:

- Caracterización demográfica, analítica y densitométrica de las pacientes con hiperparatiroidismo primario, para valorar la posible la relación de diferentes variables con la evolución de la masa ósea tras paratiroidectomía.
- Genotipar los diferentes polimorfismos de los genes candidatos para valorar su posible relación con la presencia de HPTP, su asociación con la densidad mineral ósea en el momento del diagnóstico y su influencia sobre la evolución de la masa ósea tras paratiroidectomía.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS:

1-. Diseño:

Estudio prospectivo observacional realizado entre enero del 1999 y diciembre del 2012.

2-. Ámbito:

El estudio se ha realizado en el Hospital del Mar de Barcelona en colaboración con la Unidad de Cirugía Endocrina y del Servicio de Medicina Interna. La extracción y procesamiento genético se ha realizado en la *Unitat de Recerca de Fisiopatologia Òssia i Articular del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (URFOA_IMIM)*.

3-. Pacientes:

Todas las mujeres menopáusicas diagnosticadas de HPTP en las que se ha indicado una PTx en la Unidad de Cirugía Endocrina del Hospital del Mar, han sido valoradas de forma consecutiva para su inclusión en el estudio.

Criterios de Inclusión:

- Mujeres menopáusicas diagnosticadas de HPTP.
- Pacientes tributarias de tratamiento quirúrgico. HPTP sintomático o HPTP asintomático que cumple los criterios de indicación quirúrgica determinados por los consensos internacionales de 1990/2002/2008 respectivamente (tabla 3).
- Ausencia de contraindicaciones para la cirugía.
- Disponer de estudio bioquímico y densitométrico previo a la intervención quirúrgica.
- Diagnóstico confirmado histológicamente.

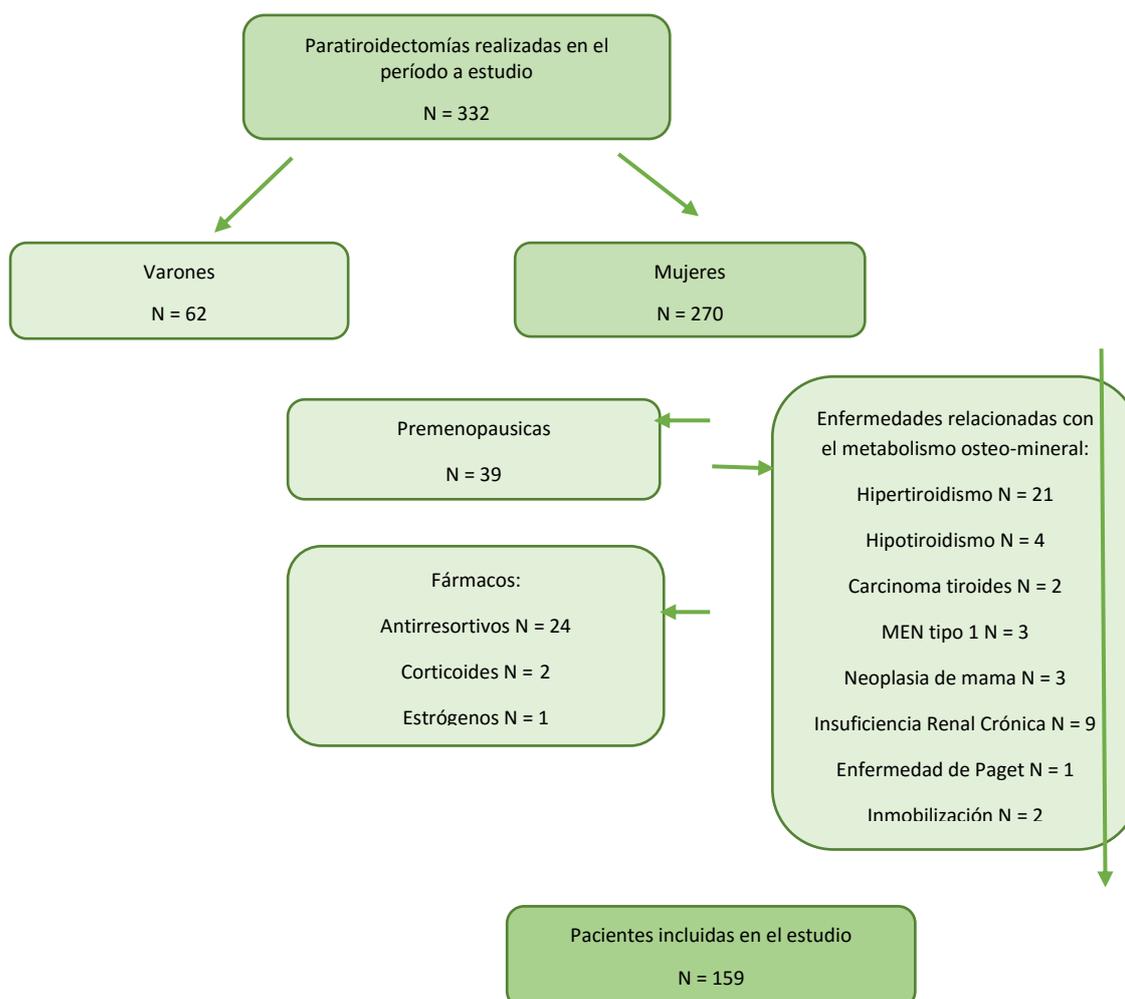
Criterios de Exclusión:

- Coexistencia de enfermedades que puedan alterar el metabolismo osteo-mineral (Paget, insuficiencia renal crónica, hipertiroidismo, insuficiencia hepática, enfermedad inflamatoria intestinal, malabsorción...).
- Trastorno en enfermedades que produzcan malnutrición o inmovilidad prolongada.
- Escoliosis severa que impida la medición de masa ósea.
- Haber recibido tratamiento con fármacos que alteren el metabolismo óseo (antiresortivos, anabólicos óseos o corticoides) antes de la intervención o durante el seguimiento.
- Negativa a participar o no disponer de consentimiento informado.

Población a estudio:

Finalmente, se han incluido en el estudio 159 mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de HPTP (Diagrama 1). Todas ellas han sido informadas de su participación en el estudio y han dado el consentimiento para el uso anónimo de sus datos clínico/demográficos con fines científicos. Se adjunta Hoja de Consentimiento Informado en el ANEXO1.

Diagrama 1: Pacientes diagnosticados de HPTP y sometidos a una Paratiroidectomía en la Unidad de Cirugía Endocrina del Hospital del Mar, que finalmente han sido incluidos en el estudio.



4-. Procedimientos de laboratorio:

En el momento del diagnóstico se ha determinado el calcio sérico total (Ca), el fósforo (P), la 25-hidroxitamina D (25-OH VitD), la 1,25-hidroxitamina D (1,25-OH₂ VitD), la PTH, la osteocalcina (OC), el N-Telopéptido (NTx) y la calciuria/fosfaturia en orina de 24 horas (Ca_o/P_o). Todas las determinaciones se han realizado también al año y a los dos años de la intervención quirúrgica.

Análisis de marcadores bioquímicos:

- El calcio sérico total y el fósforo se han analizado mediante colorimetría, utilizando un autoanalizador Roche MODULAR® ANALYTICS D/P (Coeficiente de variación (CV) interserie: < 4,6% y < 5% respectivamente). Los valores de referencia establecidos han sido:
 - *Calcio sérico total:* 8,5-10,5 mg/dL.
 - *Fósforo sérico:* 2,5-4,8 mg/dL.
- La calciuria y la fosfaturia en orina de 24 horas han sido determinadas mediante la misma técnica que el Ca y el P. Los valores de referencia han sido:
 - *Calciuria en orina de 24 horas:* 42-353 mg/24h.
 - *Fosfaturia en orina de 24 horas:* 400-1300 mg/24h.

Análisis a nivel hormonal:

- La 25-OH VitD se ha medido mediante inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) con el autoanalizador DiaSorin LIAISON® (CV interserie: < 16%). Los valores de referencia establecidos han sido:
 - *25-OH VitD*: 30-80ng/mL.
- Para determinar la 1,25-OH₂ VitD se ha utilizado un radioinmunoensayo (RIA) con el autoanalizador DiaSorin RIA® (CV interserie: 11.1%). Los valores de referencia han sido:
 - *1,25-OH₂ VitD*: 16-56 pg/mL.
- La PTH se ha medido con el inmunoensayo quimioluminiscente en fase sólida del autoanalizador Siemens IMMULITE® (CV interserie: <8%). El rango de normalidad establecido ha sido:
 - *Parathormona*: 12-65 pg/mL.

Análisis de marcadores de remodelado óseo:

- La osteocalcina ha sido determinada mediante inmunoensayo quimioluminiscente en fase sólida con el autoanalizador Siemens IMMULITE® (CV interserie: <20%). Los valores de referencia han sido:
 - *Osteocalcina*: 2-22 ng/mL.
- El N-Telopéptido se ha analizado en orina reciente de la mañana mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia amplificada en el autoanalizador VITROS ECI® de Ortho-Clinical-Diagnostics (CV interserie: <12%). Se han establecido los siguientes valores de referencia:
 - *Ntx 17-94 nmol/mmol*.

5-. Evaluación de la masa ósea:

Método de determinación de la densidad mineral ósea:

La medición de la masa ósea se ha realizado mediante densitometría por absorciometría dual fotónica (DEXA) con fuente de energía de doble haz de rayos X, utilizando un densitómetro HOLOGIC QDR 4500 SL con software APEX® versión 12,7.3 (Hologic, Waltham, Mass, USA).

Todas las pacientes incluidas en el estudio disponen de una densitometría en el momento del diagnóstico. Se ha realizado un estudio densitométrico de control al año y a los dos años del tratamiento quirúrgico.

Localización de la determinación de la densidad mineral ósea:

Inicialmente se ha procedido a la determinación de la DMO a nivel de columna lumbar (CL) total (L1-L4), cuello femoral (CF) y cadera total (CT). En nuestro centro dicha técnica tiene un coeficiente de variación "in vivo" del 1,00 % a nivel de CL, del 1,65 % a nivel de CF y del 1,60 % a nivel de CT.

Desde 2006-2007 se ha añadido a la densitometría basal la medición de la DMO a nivel de antebrazo (tercio proximal del extremo distal del radio (1/3 PR) y zona ultradistal del radio(UD)). Esto nos permite disponer de los datos de las tres localizaciones (columna, fémur y antebrazo) en 70 de las 159 mujeres incluidas en el estudio. El coeficiente de variación "in vivo" de la técnica es del 1,00% tanto en el 1/3PR y como en UD.

Criterios densitométricos de normalidad y osteoporosis

El diagnóstico de osteopenia y osteoporosis se ha llevado a cabo siguiendo los criterios establecidos por la WHO en 1994.

Todos los análisis realizados han utilizado valores absolutos de DMO en g/cm^2 en lugar de valores relativos como la T-score o la Z-score.

Los valores del pico de masa ósea en la población sana española han sido tomados del estudio realizado por Díaz-Curiel en 1997 y de los valores de referencia proporcionados por HOLOGIC® para la población española. Estos valores son:

- A nivel de columna lumbar: $1,033 \pm 0,106 \text{ g/cm}^2$
- A nivel de cuello femoral: $0,840 \pm 0,109 \text{ g/cm}^2$
- A nivel de cadera total: $0,919 \pm 0,097 \text{ g/cm}^2$
- A nivel de zona ultradistal del radio: $0,453 \pm 0,063 \text{ g/cm}^2$
- A nivel del tercio proximal del extremo distal del radio: $0,697 \pm 0,06 \text{ g/cm}^2$

6-. Análisis genético:

Selección de genes candidatos y polimorfismos:

Para la selección de genes candidatos se han buscado genes que participan de algún modo en el metabolismo osteo-mineral o en la fisiopatología del HPTP. Todos ellos han sido relacionados con anterioridad con la osteoporosis, el HPTP u otras enfermedades del metabolismo mineral.

Los genes candidatos finalmente seleccionados para probar nuestra hipótesis han sido:

- El gen del receptor de la Vitamina D (*VDR*) que se encuentra en la brazo largo del cromosoma 12.
- El gen del receptor de la PTH (*PTHr*) localizado en el brazo corto del cromosoma 3.
- El gen del receptor-sensor del Calcio (*CaSR*) localizado en el brazo largo de cromosoma 3.
- El gen del receptor estrogénico 1 (*ESR1*) localizado en el brazo largo del cromosoma 6.
- El gen de la 25-hidroxi-Vitamina D 1-alfa hidroxilasa (*CYP27B1*) localizado en el brazo largo del cromosoma 12.
- El gen de la osteoprotegerina (*TNFRSF11B* o *OPG*) que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 8.
- El gen del receptor activador del factor nuclear KB (*TNFRSF11A* o *RANK*) situado en el brazo largo del cromosoma 18.
- El gen del ligando del receptor activador del factor nuclear KB (*TNFSF11* o *RANKL*) situado en el brazo largo del cromosoma 13.

Los polimorfismos en estos genes han sido seleccionados sobre la base de los siguientes criterios: (1) el alelo de menor frecuencia se encuentra en más del 5% de la población; (2) se trata de un tag-SNP definido dentro del proyecto HapMap; (3) son polimorfismos funcionales putativos y (4) se han asociado previamente con otros fenotipos de interés.

Finalmente los polimorfismos escogidos han sido:

- Del gen *VDR* se han estudiado los siguientes polimorfismos:
 - rs7975232: También llamado polimorfismo Apa I. Se produce un cambio de una citosina por una adenina en la posición 47845054 del cromosoma 12 (intrón 10 del gen *VDR*).

- rs11568820: También llamado Cdx2. Se produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 47908762 del cromosoma 12 (intrón 1 del gen *VDR*)
- rs3847987: Se produce un cambio de una citosina por una adenina en la posición 47844285 del cromosoma 12 (exón 10 del gen *VDR*)
- Del gen *PTHR* se han estudiado los siguientes polimorfismos:
 - rs4683301: Cambio de una adenina por una timina en la posición 46889988 del cromosoma 3 (intrón 3 del gen *PTHR*).
 - rs724449: Cambio de una citosina por una timina en la posición 46894191 del cromosoma 3 (intrón 4 del gen *PTHR*).
 - rs2242116: Cambio de una adenina por una guanina en la posición 46899626 del cromosoma 3 (intrón 10 del gen *PTHR*).
- Del gen *CaSR* se han estudiado los siguientes polimorfismos:
 - rs1042636: Se produce un cambio de una adenina por una guanina en la posición 122284922 del cromosoma 3 (exón 7 del gen *CaSR*).
 - rs1801725: Se produce un cambio de una guanina por una timina en la posición 122284910 del cromosoma 2 (exón 7 del gen *CaSR*).
- Del gen *ESR1* se ha estudiado el siguiente polimorfismo:
 - rs2504063: Se produce un cambio de una guanina por una adenosina en la localización 151769572 del cromosoma 6 (intrón 2 del gen *ESR1*).
- Del gen *CYP27B1* se ha estudiado el siguiente polimorfismo:
 - rs4646536: Cambio de una adenina por una guanina en la posición 57764205 del cromosoma 12 (intrón 6 del gen *CYP27B1*).
- Del gen *OPG* se ha estudiado el siguiente polimorfismo:
 - rs1032128: Se produce un cambio de una guanina por una adenosina en la posición 118939534 del cromosoma 8 (intrón 1 del gen *OPG*).
- Del gen *RANK* se ha estudiado el siguiente polimorfismo:
 - rs884205: Se produce el cambio de una adenina por una citosina en la posición 62387624 del cromosoma 18 (exón 7 del gen *RANK*).
- Del gen *RANKL* se ha estudiado el siguiente polimorfismo:
 - rs9594738: Se produce un cambio de citosina por timina en la localización 42378009 del cromosoma 13 (región reguladora intergenética).

La prevalencia en población sana de los diferentes polimorfismos estudiados ha sido obtenida del PROYECTO GENOMOS 1000.

Extracción de DNA:

El DNA genómico se ha obtenido, a partir de leucocitos de sangre periférica, mediante dos procedimientos:

- Mediante el Kit Wizard Genomic para purificación de DNA (Promega). El procedimiento de extracción se detalla en el ANEXO 2.

- Por Autopure LS, una estación de trabajo robotizada para la purificación automatizada de DNA genómico, en los laboratorios de Servicios de Apoyo de Laboratorio Biomédico, IMIM, Barcelona (España).

Genotipado de polimorfismos:

El genotipado de los polimorfismos se ha realizado en Kbioscience, LGC genomics (Herts, Inglaterra) utilizando el sistema de Kaspar v4.0 y el algoritmo Kraken alelo.

Para el control de calidad se han re-genotipado aleatoriamente un 8.7% de las muestras, objetivándose una concordancia del 97.5%.

7-. Análisis estadístico:

Los análisis descriptivos de las variables demográficas, analíticas y densitométricas se han presentado en forma de medias y frecuencias. Se ha realizado la prueba de Levene de calidad de Varianzas para comparar las características de las pacientes que han concluido el estudio con las de las pacientes de las que no disponemos de seguimiento.

Para la comparación de variables cuantitativas se ha usado la T- student para datos apareados. Cuando la variable no ha seguido una distribución normal se ha utilizado la prueba U de Mann-Whitney.

La evolución de la DMO tras la cirugía, estratificada por grupos de Osteoporosis/Osteopenia/Normalidad, ha sido analizada mediante una χ^2 .

Se han realizado análisis de regresión lineal univariante y multivariante para determinar las posibles variantes que influyen en la recuperación de la DMO tras la PTx.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ha sido calculado mediante χ^2 para cada polimorfismo estudiado.

La comparación entre la prevalencia de los diferentes polimorfismos estudiados en nuestra muestra y la población sana de referencia, ha sido realizada mediante una χ^2 .

La relación entre los diferentes polimorfismos y la DMO basal, así como su evolución tras la cirugía, ha sido estudiada mediante Análisis de la Varianza (ANOVA).

Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa estadístico SPSS v.13.0 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA). Todos los valores de p inferiores a 0.05 se han considerado estadísticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS:

OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA, CLÍNICA Y ANALÍTICA DE LAS PACIENTES CON HPTP PARA VALORAR LA POSIBLE RELACIÓN DE DIFERENTES VARIABLES CON LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.

1.a - Características demográficas:

Las características demográficas de las pacientes incluidas en el estudio se muestran en la Tabla 4. Estos datos demográficos se han obtenido a través de la historia clínica. Aquellos parámetros que no constaban en la historia han sido recuperados mediante una entrevista telefónica.

Tabla 4: Características demográficas de la muestra en el momento de la intervención quirúrgica	
Edad * (años)	65,9 ± 9,9
Peso * (Kg)	68 ± 10,6
Talla * (cm)	156 ± 6,4
Edad menarquia * (años)	13 ± 1,6
Edad menopausia * (años)	47,7 ± 6,1
Hijos *	2,4 ± 1,3
Ingesta diaria de calcio * (mg)	889,9 ± 270,5
Fumadora ** (Si/No/Ex)	7,65 / 85,98 / 6,37
Hábito enólico ** (Si/No)	0 / 100
<i>* Datos presentados como media ± desviación estándar</i>	
<i>** Porcentajes</i>	

No se han encontrado diferencias significativas entre las características demográficas basales de las pacientes que han finalizado el estudio con las de las pacientes de las que no se dispone de seguimiento (ANEXO 3-Tabla 1)

1.b - Características analíticas y densitométricas en el momento del diagnóstico:

La población estudiada ha presentado unas características bioquímicas basales que han permitido el diagnóstico de HPTP (Tabla 5). La calcemia ha superado los límites de la normalidad en el 69,2% de las pacientes, siendo la determinación máxima de 17,6 mg/dL. Solo el 22,4% de las pacientes han presentado una fosfatemia inferior a 2,5mg/dL, siendo el valor más bajo detectado de 1,1 mg/dL. La PTH ha sido superior a 65 pg/mL en el 95,5% de las pacientes y superior a 300 pg/mL en el 9% de los casos. Se ha objetivado un déficit de 25-OH VitD (definido como < 30ng/mL) en el 84,51% de las pacientes y una elevación de 1,25-OH₂ VitD en el 48,4% de los casos.

A nivel analítico y densitométrico, tampoco se han encontrado diferencias significativas entre las pacientes que han finalizado el estudio y las pacientes de las que no se dispone de seguimiento (ANEXO 3-Tabla1).

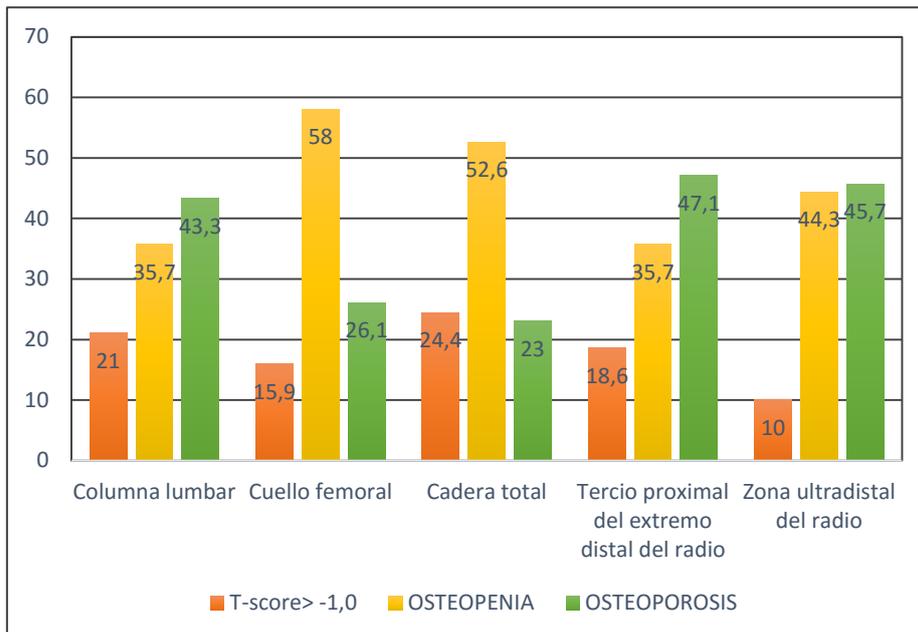
Tabla 5: Valores analíticos y densitométricos en el momento del diagnóstico

Ca (mg/dL)	11,1 ± 0,9
P (mg/dL)	2,9 ± 0,6
25-OH VitD (ng/mL)	19,7 ± 13,3
1,25- OH ₂ VitD (pg/mL)	59,3 ± 24,9
PTH (pg/mL)	177,9 ± 163,3
OC (ng/mL)	9,5 ± 9
NTx (nmol/mmol Cr)	67,6 ± 45,7
Ca _o (mg/24h)	347,4 ± 186,9
P _o (mg/24h)	865,6 ± 377,9
DMO a nivel de CL (g/cm ²)	0,807 ± 0,150
DMO a nivel de CF (g/cm ²)	0,626 ± 0,100
DMO a nivel de CT (g/cm ²)	0,756 ± 0,132
DMO a nivel de 1/3 PT (g/cm ²)	0,549 ± 0,086
DMO a nivel UD (g/cm ²)	0,307 ± 0,064

Rango de normalidad: Ca 8,5-10,5 mg/dL; P 2,5-4,8 mg/dL; 25-OH VitD 30-80ng/mL; 1,25-OH₂-VitD 16-56 pg/mL; PTH 12-65 pg/mL, OC 2-22 ng/mL; Ntx 17-94 nmol/mmol Cr; Ca_o 42-353 mg/24h; P_o 400-1300 mg/24h.

Los valores basales de la DMO a nivel de columna, fémur y antebrazo se muestran en la Tabla 5. A nivel de columna lumbar, el 43,3% de las pacientes se han diagnosticado de osteoporosis y el 35,7% de osteopenia. A nivel de cuello femoral, el 84,1 % de las pacientes han presentado una DMO baja (el 26,1% en forma de osteoporosis y el 58 % en forma de osteopenia) y a nivel de cadera total este porcentaje se ha situado en el 75,6% (23% osteoporosis y 52,6% osteopenia). La localización con afectación ósea más severa ha sido el antebrazo, dónde el 45,7% de las pacientes han presentado osteoporosis a nivel de la zona ultradistal del radio y el 47,1% a nivel del tercio proximal del extremo distal del radio (Figura 15).

Figura 15: Porcentaje de osteopenia/osteoporosis en el momento del diagnóstico en las diferentes localizaciones estudiadas



1.c. Evolución de las variables analíticas y densitométricas tras intervención quirúrgica:

Se ha observado una disminución estadísticamente significativa del calcio sérico y de la PTH tras paratiroidectomía (Tabla 6). Solo 2 pacientes han persistido con hipercalcemia al año y a los dos años de la intervención quirúrgica, con unos valores de 10,6 y 10,8 mg/dL en ambas ocasiones. Respecto a la PTH, al año de la PTx, el 73,6% de los pacientes han reducido los valores de PTH hasta mantenerse en el rango de la normalidad. Este porcentaje ha aumentado hasta el 84,3% a los dos años de seguimiento. De los pacientes que han mantenido una PTH elevada a los dos años de seguimiento, solo en un caso se ha detectado una hipercalcemia leve (valor de 10,6 mg/dL). En el 84% de los pacientes con PTH elevada se ha asociado un déficit de 25-OH VitD, y el 16% restante han presentado valores en el límite bajo de la normalidad (entre 30,30-43,6 ng /mL)

Tabla 6: Evolución de los parámetros analíticos y densitométricos, al año y a los dos años del tratamiento quirúrgico

	Pre-PTx n=159*	Post-PTx (al año) n=142*	p	Post-PTx (2 años) n=92*	p
Ca (mg/dl)	11 ± 0,9	9,5 ± 0,5	<0,001	9,5 ± 0,5	<0,001
P (mg/dl)	2,9 ± 0,6	3,5 ± 0,5	<0,001	3,6 ± 0,5	<0,001
25-OH VitD (ng/ml)	19,7 ± 13,9	23,7 ± 17,1	0,029	27,9 ± 20,5	0,004
1,25- OH ₂ VitD (pg/ml)	60,9 ± 24	43,2 ± 17,1	<0,001	40,6 ± 15,8	<0,001
PTH (pg/ml)	170,6 ± 144,6	55,5 ± 34,9	<0,001	53,1 ± 30,1	<0,001
OC (ng/ml)	7,9 ± 5,9	3,4 ± 1,9	0,013	3,6 ± 1,5	0,002
NTx (nmol/mmol Cr)	72,61 ± 35,6	43,3 ± 26,7	0,011	42,8 ± 33,7	0,036
Ca _o (mg/24h)	396,7 ± 141,6	199,3 ± 77,7	<0,001	199,5 ± 148,5	<0,001
P _o (mg/24h)	959,71 ± 134,2	646 ± 303,8	0,014	694,4 ± 342	0,014
DMO a nivel de CL (g/cm ²)	0,801 ± 0,146	0,832 ± 0,147	<0,001	0,827 ± 0,139	<0,001
DMO a nivel de CF (g/cm ²)	0,626 ± 0,102	0,647 ± 0,103	<0,001	0,653 ± 0,102	<0,001
DMO a nivel de CT (g/cm ²)	0,762 ± 0,120	0,786 ± 0,121	<0,001	0,791 ± 0,112	<0,001
DMO a nivel de 1/3 PT (g/cm ²)	0,547 ± 0,083	0,545 ± 0,081	NS	0,534 ± 0,079	NS
DMO a nivel UD (g/cm ²)	0,299 ± 0,062	0,307 ± 0,061	<0,001	0,314 ± 0,062	0,019

Rango de normalidad: Ca 8,5-10,5 mg/dl; P 2,5-4,8 mg/dl; 25-OH VitD 30-80ng/ml; 1,25-OH-VitD 16-56 pg/ml; PTH 12-65 pg/ml, OC 2-22 ng/ml; Ntx 17-94 nmol/mmol Cr; Ca_o 42-353 mg/24h; P_o 400-1300 mg/24h.

**La población de la que se dispone de determinación de DMO a nivel de antebrazo es: 70 pacientes en el momento del diagnóstico, 57 al año de la PTx y 38 a los dos años de la PTx.*

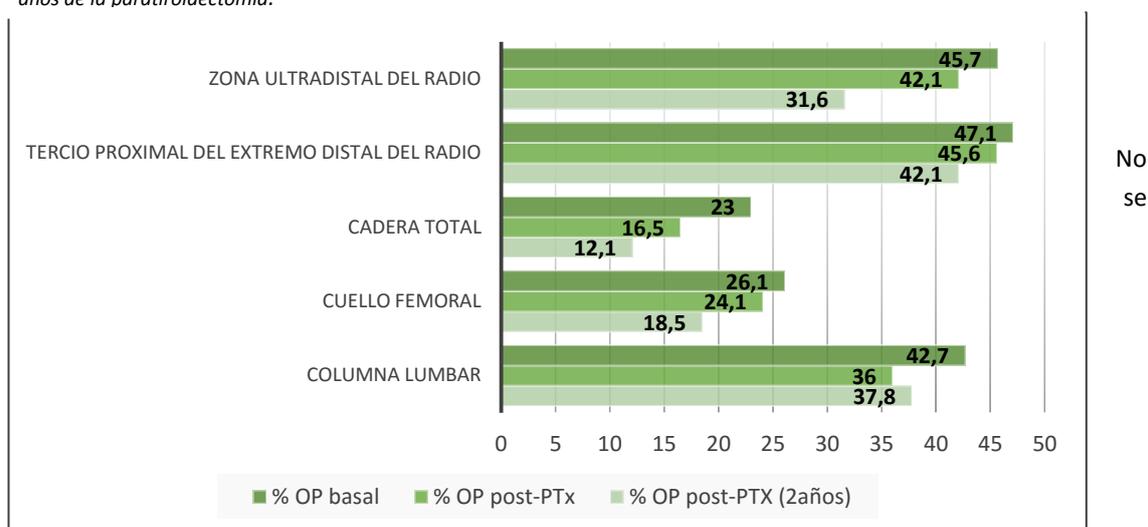
Respecto a la evolución de la DMO tras PTx, ha habido un aumento significativo de la masa ósea a nivel de columna lumbar, cuello femoral, cadera total y zona ultradistal del radio al año de la intervención quirúrgica (Tabla 6). Este aumento de la DMO se ha mantenido a los dos años de la PTx sin apreciarse cambios significativos entre el primer y el segundo año de la cirugía (p=0,390 en CL, p=0,689 en CF, p=0,605 en CT y p=0,413 en UD).

Teniendo en cuenta el porcentaje de cambio al año de la PTx, se ha observado un incremento de DMO del 4,45% en CL (IC para 95%: de 3,19% a 5,72%), del 3,28% en CF (IC para 95%: de 2,21% a 4,34%), del 3,28% en CT (IC para 95%: de 2,4% a 4,1%) y del 2,95% en UD (IC para 95%: de 1,59 a 4,31%).

A nivel de 1/3 PT no ha habido un aumento significativo de la DMO tras la PTx y tampoco el porcentaje de cambio ha sido estadísticamente valorable.

La mejoría de la DMO objetivada, ha significado una disminución estadísticamente significativa de la prevalencia de osteoporosis en las pacientes postoperadas ($p < 0,001$ en CL, CT y CF). Los cambios en la prevalencia de osteoporosis se muestran en la Figura 16.

Figura 16: Evolución del porcentaje de pacientes con osteoporosis en el momento del diagnóstico, al año y a los dos años de la paratiroidectomía.



han podido realizar los estudios de evolución de prevalencia de osteoporosis antes y después de la cirugía a nivel de antebrazo (zona UD y 1/3 PT del radio) debido a que el tamaño muestral no ha permitido dar validez estadística a los resultados.

1.d-. Predictores demográficos, analíticos y densitométricos en la recuperación de la DMO tras PTx:

Se ha realizado un análisis de regresión lineal univariable para analizar la evolución de la DMO tras PTx teniendo en cuenta parámetros demográficos como la edad, los años de menopausia, el índice de masa corporal, el hábito tabáquico y la ingesta diaria de calcio (Tabla 7). Sólo en el estudio de cadera total se ha demostrado la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la edad y los años de menopausia, con la recuperación de la masa ósea. A menor edad, mayor recuperación de DMO tras la cirugía (por cada año menos de edad respecto a la media basal ha habido un incremento de 0,0008 g/cm² de DMO tras la PTx, con una $p=0,0157$) y a más años de menopausia en el momento del diagnóstico, menor recuperación de DMO tras la intervención quirúrgica (por cada año de menopausia por encima de la media se han recuperado 0,0006 g/cm² menos de DMO tras PTx, con una $p=0,026$). En definitiva, las mujeres más jóvenes y las que presentan una menopausia más tardía han presentado una mayor recuperación de la DMO a nivel de cadera total tras la PTx.

Se ha utilizado el mismo modelo de regresión lineal univariable para analizar la posible influencia de los parámetros analíticos en el cambio de DMO tras la intervención quirúrgica (Tabla 7). Este análisis ha demostrado que una mayor PTH en el momento del diagnóstico, así como una mayor disminución de ésta tras la PTx, se relaciona con un mayor incremento de DMO en todas las localizaciones. En cuanto a los metabolitos de la vitamina D, a nivel de cadera total se ha evidenciado una relación entre una 1,25-OH₂ VitD basal elevada y un mayor incremento de la DMO tras la PTx. Así mismo, se ha relacionado una mayor 25-OH VitD al año de la cirugía con una mayor recuperación de DMO a nivel de cuello femoral.

Tabla 7: Predictores de ganancia de DMO tras PTx en pacientes con HPTP						
Análisis de regresión lineal Univariable						
	Columna lumbar		Cuello femoral		Cadera total	
	Δ DMO	p	Δ DMO	p	Δ DMO	p
Edad	-0,0002	NS	-0,0003	NS	-0,0008	0,0157
Años de menopausia	< -0,0001	NS	-0,0004	NS	-0,0006	0,0260
IMC	-0,0002	NS	0,0010	NS	0,0006	NS
Hábito tabáquico	-0,0088	NS	0,0129	NS	0,0096	NS
Ingesta Calcio	<-0,0001	NS	<-0,0001	NS	<-0,0001	NS
PTH basal	0,0001	0,0091	0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001
Cambio de PTH tras PTx	0,0001	0,0244	0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001
25-OH VitD Basal	-0,0002	NS	0,0001	NS	0,0000	NS
Cambio de 25-OH VitD tras PTx	-0,0001	NS	-0,0002	NS	0,0001	NS
25-OH VitD al año PTx	<-0,0001	NS	0,0004	0,0238	<-0,0001	NS
1,25-OH₂ VitD Basal	0,0003	NS	0,0002	NS	0,0003	0,0143
Cambio de 1,25-OH₂ VitD tras PTx	0,0001	NS	0,0002	NS	0,0002	NS
Análisis de regresión lineal Multivariable						
	Columna lumbar		Cuello femoral		Cadera total	
	Δ DMO	p	Δ DMO	p	Δ DMO	p
Edad	0,0001	NS	-0,0008	NS	-0,0005	NS
Años de menopausia	-0,0005	NS	-0,0003	NS	-0,0005	NS
IMC	0,0017	0,0893	0,0021	0,0078	0,0014	0,0647
Ingesta calcio	<-0,0001	NS	-0,0000	NS	<-0,0001	0,0288
Cambio de PTH	0,0001	0,0479	0,0001	0,0007	0,0001	0,001
25-OH VitD basal	-0,0001	NS	0,0003	NS	0,0003	NS
25-OH VitD al año	0,0002	NS	0,0004	0,0345	0,0000	NS
Cambio de 25-OH VitD	-0,0002	NS	-0,0001	NS	0,0001	NS
DMO basal	-0,0544	0,0756	-0,1177	0,0047	-0,0637	0,0308
<i>Δ DMO: Cambio de DMO tras la PTx por cada unidad por debajo de la media de las variables analizadas</i>						
<i>El análisis de regresión lineal multivariable incluye un ajuste para todas las variables enumeradas en la tabla</i>						

Al realizar el análisis mediante un modelo de regresión lineal multivariante (Tabla 7), se ha observado que el único parámetro que se asocia a una mayor recuperación de DMO en todas las localizaciones es el cambio de PTH; a mayor disminución de PTH tras la cirugía, mayor aumento de DMO.

Una menor DMO basal se ha relacionado con una mayor recuperación de DMO tras la PTx a nivel de cadera total y cuello femoral, tendiendo a la significación a nivel de columna lumbar ($p=0,075$).

La baja ingesta de calcio en el momento del diagnóstico se ha asociado a una mayor recuperación de DMO tras la cirugía a nivel de cadera total. Así mismo, una 25-OH VitD elevada al año de la PTx se ha relacionado con una mayor recuperación de DMO a nivel de cuello femoral.

Al analizar los parámetros demográficos, se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre el IMC y la recuperación de DMO a nivel de cuello femoral. A nivel de cadera total y columna lumbar esta relación ha tendido a la significación con una $p=0,06$ y $p=0,08$ respectivamente.

No se han realizado análisis de regresión lineal univariante ni multivariante con los datos densitométricos del antebrazo ni a los dos años de seguimiento, por no disponer de un tamaño muestral adecuado para obtener resultados estadísticamente significativos.

OBJETIVO: GENOTIPAR LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS DE LOS GENES CANDIDATOS PARA VALORAR SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO, SU ASOCIACIÓN CON LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.

2,a -. Resultado del genotipado de los polimorfismos genéticos estudiados:

De las 159 pacientes incluidas en el estudio, se ha obtenido muestra para el estudio genético en 104 casos. Se ha realizado una prueba de Levene de calidad de varianzas que no muestra diferencias significativas entre la población de la que se dispone de muestra para genética y la población perdida (ANEXO 3 – Tabla2).

La frecuencia del alelo minoritario (MAF) de la cohorte presentada y de la población control, el equilibrio de Hardy-Weinberg y la eficiencia del genotipado en los polimorfismos seleccionados se describen en la Tabla 8.

Tabla 8: Genotipado de los polimorfismos seleccionados						
Gen	SNP	Alelos R/A	MAF cohorte HPTP	MAF población control	p-valor HWE	Eficiencia de genotipado
VDR	rs7975232	A/C	0,47(C)	0,40 (C)	0,113	100%
	rs11568820	C/T	0,27(T)	0,22 (T)	0,642	100%
	rs3847987	C/A	0,13(A)	0,12 (A)	0,188	100%
PTHr	rs4683301	A/T	0,42(A)	0,35 (A)	0,870	99%
	rs724449	C/T	0,42(C)	0,37 (C)	0,870	100%
	rs2242116	A/G	0,40(A)	0,36 (A)	0,750	99%
CaSR	rs1042636	A/G	0,03(G)	0,07 (G)	0,797	100%
	rs1801725	G/T	0,18(T)	0,13 (T)	0,148	99%
ESR1	rs2504063	A/G	0,41(A)	0,39 (A)	0,813	100%
CYP27B1	rs4646536	A/G	0,27(G)	0,33 (G)	0,102	98,1%
OPG	rs1032128	G/A	0,23(A)	0,26 (A)	0,466	99%
RANK	rs884205	A/C	0,21(A)	0,25 (A)	0,823	100%
RANKL	rs9594738	C/T	0,44(T)	0,46 (T)	0,895	100%

R (Alelo de referencia)/A (Alelo alternativo); MAF (am) Frecuencia del alelo menor; HWE Equilibrio de Hardy-Weinberg.

2,b-. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el hiperparatiroidismo primario:

Se ha realizado un estudio de asociación para comparar la prevalencia de los alelos y genotipos de cada uno de los polimorfismos estudiados entre las pacientes con HPTP y la población control, con la finalidad de asociar la presencia de un determinado alelo y/o genotipo con la enfermedad.

Las prevalencias genotípicas y alélicas de los diferentes polimorfismos estudiados se muestran en la tabla 9. Así mismo, se muestran las diferencias entre la población estudiada (mujeres postmenopáusicas afectas de HPTP) y la población control.

Se han encontrado dos polimorfismos asociados con el HPTP: el polimorfismo rs7975232 del gen *VDR* y el rs1042636 del gen *CaSR*. El genotipo A/C para el polimorfismo rs7975232 del gen *VDR* y el genotipo A/A para el polimorfismo rs1042636 del gen *CaSR* son más frecuentes en pacientes con HPTP que en la población control (0,022 y 0,048 respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas si se corrigen los resultados por el método de Bonferroni ($p > 0,004$).

Por otro lado, los análisis de las frecuencias alélicas entre poblaciones no han mostrado diferencias estadísticamente significativas, aunque el alelo A del polimorfismo rs1042636 del gen *CaSR* tiende a ser más frecuente en las pacientes con HPTP ($p = 0,054$).

Tabla 9: Frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes polimorfismos estudiados							
Gen	SNP	Frecuencia genotípica	Frecuencia genotípica poblacional*	p	Frecuencia alélica	Frecuencia alélica poblacional*	p
VDR	rs7975232	A/A 25,2% A/C 57,3% C/C 17,5%	40,4% 38,4% 21,2%	0,022	A 59,6% 53,4% C 46,6%	40,4%	NS
	rs11568820	T/T 6,8% T/C 40,8% C/C 52,4%	5,1% 34,3% 60,1%	NS	T 22,2% 27,2% C 72,8%	77,8%	NS
	rs3847987	A/A 1% A/C 23,3% C/C 75,7%	3% 17,2% 79,8%	NS	A 11,6% 12,6% C 87,4%	88,4%	NS
PTHR	rs4683301	T/T 33,3% T/A 49% A/A 17,7%	42,4% 49,5% 10,1%	NS	T 65,2% 57,8% A 42,2%	34,8%	NS
	rs724449	T/T 33% T/C 49,5% C/C 17,5%	43,4% 38,4% 18,2%	NS	T 62,6% 57,8% C 42,2%	37,4%	NS
	rs2242116	A/A 15,7% A/G 49% G/G 35,3%	16,2% 40,4% 43,4%	NS	A 36,4% 40,2% G 59,8%	63,6%	NS
CaSR	rs1042636	A/A 94,1% A/G 5,8%	85,8% 14,2%	0,048	A 92,9% 97,2% G 2,9%	7,1%	0,054
	rs1801725	T/T 1% T/G 33,3% G/G 65,7%	1% 24,3% 74,7%	NS	T 13,1% 17,6% G 82,4%	86,9%	NS
ESR1	rs2504063	A/A 16,5% A/G 49,5% G/G 34%	16,1% 46,5% 37,4%	NS	A 39,4% 41,3% G 58,7%	60,6%	NS
CYP27B1	rs4646536	A/A 46,1% A/G 50% G/G 3,9%	42,4% 49,5% 8,1%	NS	A 67,2% 73,3% G 26,7%	32,8%	NS

OPG	rs1032128	A/A 4% A/G 38% G/G 58%	7,1% 38,4% 54,5%	NS	A 23% G 77%	26,3% 73,7%	NS
RANK	rs884205	A/A 5% A/C 33% C/C 62%	5% 38,4% 56,6%	NS	A 21,4% C 78,6%	24,8% 75,8%	NS
RANKL	rs9594738	T/T 19,5% T/C 48,5% C/C 32%	19,2% 52,5% 28,3%	NS	T 43,7% C 56,3%	45,5% 54,5%	NS

*Como población control se ha utilizado la población CEU (Residentes del estado de Utah con antepasados europeos) de la base de datos del proyecto "1000 genomes"

2.c.- Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico:

Para valorar la relación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico de HPTP, se ha realizado un análisis de la varianza mediante tres modelos de herencia: el modelo aditivo, el modelo dominante (tomando el alelo de referencia como alelo dominante) y el modelo recesivo (tomando el alelo de referencia como alelo recesivo).

A nivel de columna lumbar, se han encontrado dos polimorfismos relacionados con la DMO basal (Tabla 10). Estos polimorfismos son el rs9594738 del gen *RANKL* y el rs1032128 del gen *OPG*. En el modelo recesivo, se ha relacionado el alelo C del rs9594738 del gen *RANKL* y el alelo G del rs1032128 del gen *OPG* con una mayor DMO a nivel de columna lumbar en el momento del diagnóstico ($p=0,029$ y $p=0,020$ respectivamente). Sin embargo, si estos resultados se corrigen por el método de Bonferroni, la p obtenida no es suficiente para alcanzar la significación estadística.

Tabla 10: Polimorfismos y DMO basal en columna lumbar								
Gen	SNP	Genotipo	DMO basal	p	Modelo Dominante	p	Modelo Recesivo	p
VDR	rs7975232	A/A	0,850±0,158	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A	NS
		A/C	0,800±0,136				A/C+C/C	
		C/C	0,835±0,143					
	rs11568820	T/T	0,848±0,079	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T	NS
		T/C	0,812±0,136				T/C+C/C	
		C/C	0,822±0,155					
	rs3847987	A/A	0,802	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A	NS
		A/C	0,870±0,179				A/C+C/C	
		C/C	0,803±0,129					
PTHR	rs4683301	T/T	0,808±0,143	NS	T/T+T/A A/A	NS	T/T	NS
		T/A	0,819±0,155				T/A+A/A	
		A/A	0,841±0,114					
	rs724449	T/T	0,808±0,143	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T	NS
		T/C	0,819±0,155				T/C+C/C	
		C/C	0,841±0,114					
	rs2242116	A/A	0,830±0,109	NS	A/A+A/G G/G	NS	A/A	NS
		A/G	0,824±0,156				A/G+G/G	
		G/G	0,809±0,141					

CaSR	rs1042636	A/A A/G	0,819±0,149 0,824±0,086	NS				
	rs1801725	T/T T/G G/G	0,920 0,812±0,132 0,823±0,150	NS	T/T+T/G G/G	NS	T/T T/G+G/G	NS
ESR1	rs2504063	A/A A/G G/G	0,831±0,154 0,803±0,141 0,837±0,144	NS	A/A+A/G G/G	NS	A/A A/G+G/G	NS
CYP27B1	rs4646536	A/A A/G G/G	0,828±0,137 0,812±0,153 0,821±0,082	NS	A/A+A/G G/G	NS	A/A A/G+G/G	NS
OPG	rs1032128	A/A A/G G/G	0,604±0,150 0,836±0,141 0,820±0,138	0,054	A/A+A/G G/G	NS	A/A A/G+G/G	0,020
RANK	rs884205	A/A A/C C/C	0,842±0,154 0,833±0,135 0,811±0,149	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A A/C+C/C	NS
RANKL	rs9594738	T/T T/C C/C	0,755±0,154 0,851±0,137 0,809±0,135	0,053	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	0,029

Los análisis realizados a nivel de cuello femoral, cadera total, zona ultradistal del radio y 1/3 proximal del extremo distal del radio; no han mostrado ninguna relación estadísticamente significativa entre los diferentes polimorfismos estudiados y la masa ósea en el momento del diagnóstico.

2.d. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el cambio de DMO post paratiroidectomía:

Se ha realizado un análisis de la varianza para valorar la relación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el cambio relativo de DMO tras la PTx, en las cinco localizaciones de las que disponemos de medidas densitométricas. Estos cálculos se han realizado teniendo en cuenta modelos aditivos, dominantes y recesivos.

Se ha encontrado relación entre el polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1* y el cambio de la masa ósea tras PTx en cadera total ($p=0,023$). En el modelo recesivo, la presencia del alelo G se asocia a una mayor recuperación de la masa ósea a nivel de cadera total ($p=0,006$). Estos resultados, tras ser sometidos al factor de corrección de Bonferroni, rozan la significación estadística (Tabla 11).

Tabla 11: Polimorfismos y cambio de DMO post PTx en cadera total								
Gen	SNP	Genotipo	Δ DMO relativa	p	Modelo Dominante	p	Modelo Recesivo	p
VDR	rs7975232	A/A A/C C/C	0,041±0,012 0,031±0,005 0,034±0,012	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A A/C+C/C	NS
	rs11568820	T/T T/C C/C	0,041±0,015 0,030±0,007 0,036±0,007	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	NS
	rs3847987	A/A A/C C/C	0,016 0,037±0,012 0,033±0,005	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A A/C+C/C	NS
PTHr	rs4683301	T/T T/A A/A	0,040±0,009 0,033±0,007 0,029±0,011	NS	T/T+T/A A/A	NS	T/T T/A+A/A	NS
	rs724449	T/T T/C C/C	0,040±0,009 0,032±0,007 0,029±0,011	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	NS
	rs2242116	A/A	0,030±0,012	NS	A/A+A/G	NS	A/A	NS

		A/G G/G	0,033±0,007 0,037±0,009		G/G		A/G+G/G	
CaSR	rs1042636	A/A A/G	0,034±0,005 0,035±0,014	NS				
	rs1801725	T/T T/G G/G	0,001 0,035±0,010 0,033±0,005	NS	T/T+T/G G/G	NS	T/T T/G+G/G	NS
ESR1	rs2504063	A/A A/G G/G	0,023±0,010 0,028±0,007 0,047±0,009	0,136	A/A+A/G G/G	0,063	A/A A/G+G/G	NS
CYP27B1	rs4646536	A/A A/G G/G	0,025±0,007 0,042±0,007 0,043±0,028	0,023	A/A+A/G G/G	NS	A/A A/G+G/G	0,006
OPG	rs1032128	A/A A/G G/G	0,009±0,016 0,043±0,007 0,030±0,007	NS	A/A+A/G G/G	NS	A/A A/G+G/G	NS
RANK	rs884205	A/A A/C C/C	0,001±0,025 0,047±0,009 0,030±0,006	NS	A/A+A/C C/C	NS	A/A A/C+C/C	NS
RANKL	rs9594738	T/T T/C C/C	0,024±0,009 0,033±0,007 0,042±0,009	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	NS

Si se tienen en cuenta las concentraciones de 25-OH VitD y de 1,25-OH₂ VitD asociadas al alelo G del polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1*, en un modelo de análisis recesivo; se observa que las pacientes con dicho alelo tienen una concentración menor de 25-OH VitD (20,21 ng/ml vs 21,12 ng/ml) y una concentración mayor de 1,25-OH₂ VitD (61,84 pg/ml vs 55,03 pg/ml) que las pacientes con alelo A en el momento del diagnóstico. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Así mismo, la presencia del alelo A en el modelo dominante para el polimorfismo rs2504063 del gen del *ESR1* ha rozado la significación estadística (p=0,063); relacionándose con una menor recuperación de la masa ósea a nivel de cadera total (Tabla 11).

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los polimorfismos estudiados y el cambio de DMO tras PTx en columna lumbar, cuello femoral, zona ultradistal y tercio proximal del radio.

Sin embargo, los resultados del análisis del SNP rs9594738 del gen del *RANKL* merecen una atención especial. A pesar de que este polimorfismo no se ha relacionado de forma estadísticamente significativa con el cambio de DMO tras la PTx en ninguno de los modelos analizados, sí que se ha encontrado una tendencia a la significación a nivel de cuello femoral y zona ultradistal del radio. La presencia del alelo T para el modelo dominante se asocia a una menor recuperación de masa ósea a nivel de cuello femoral (p=0,073) y la presencia del alelo C en el modelo recesivo se asocia a una mayor recuperación de la DMO a nivel de la zona ultradistal del radio (p=0,051).

Tabla 12: Relación entre los diferentes genotipos del SNP rs9594738 del gen del RANKL y el cambio de DMO tras PTx en todas las localizaciones estudiadas,

Localización densitométrica	Genotipo	Δ DMO relativa	p	Modelo Dominante	p	Modelo Recesivo	p
Columna Lumbar	T/T	0,039±0,019	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	NS
	T/C	0,034±0,006					
	C/C	0,038±0,011					
Cuello Femoral	T/T	0,027±0,016	0,194	T/T+T/C C/C	0,073	T/T T/C+C/C	NS
	T/C	0,031±0,008					
	C/C	0,059±0,013					
Cadera Total	T/T	0,024±0,009	NS	T/T+T/C	NS	T/T	NS

	T/C C/C	0,033±0,007 0,042±0,009		C/C		T/C+C/C	
Zona ultradistal	T/T T/C C/C	0,009±0,017 0,024±0,012 0,045±0,013	0,081	T/T+T/C C/C	0,076	T/T T/C+C/C	0,051
1/3 Proximal del extremo distal del radio	T/T T/C C/C	0,007±0,016 -0,006±0,014 -0,006±0,007	NS	T/T+T/C C/C	NS	T/T T/C+C/C	NS

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN:

OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA, DENSITOMÉTRICA Y ANALÍTICA DE LAS PACIENTES CON HPTP PARA VALORAR LA POSIBLE RELACIÓN DE DIFERENTES VARIABLES CON LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.

1.a- Características demográficas:

Los efectos de la PTH sobre el hueso son complejos y paradójicos, ya que ésta puede tener un efecto catabólico y/o anabólico en función del modo de exposición. Mientras que la exposición continua induce una pérdida de masa ósea predominantemente a nivel de hueso cortical, la administración intermitente aumenta la masa ósea trabecular [Neer y col, 2001; Mosekilde L, 2008].

El HPTP es una enfermedad endocrinológica que afecta a múltiples órganos, entre los que destaca el hueso y el riñón. Una de sus manifestaciones clásicas es la osteítis fibrosa quística; dónde el exceso de PTH produce una destrucción ósea a nivel del hueso cortical (predominantemente en huesos largos y mandíbula) que se evidencia a nivel radiológico mediante quistes óseos verdaderos y/o tumores pardos. Actualmente esta forma de presentación es muy poco frecuente, ya que la gran mayoría de pacientes se encuentran asintomáticos y el diagnóstico se establece tras hallarse de forma casual una hipercalcemia en analíticas de rutinas. En estos casos la afectación ósea predominante es una disminución en la DMO evidenciada a través del estudio densitométrico.

El HPTP afecta mayoritariamente a mujeres (ratio hombre:mujer 3:7) y su incidencia aumenta claramente con la edad [Wermers y col, 2006; Yeh y col, 2013, Silverberg y col, 2014]. Esta característica demográfica coincide con el pico de incidencia de otra enfermedad, la osteoporosis. Es decir, el subgrupo de población más afectado por el HPTP y por la Osteoporosis son las mujeres postmenopáusicas.

El estudio presentado analiza la evolución de la masa ósea tras PTx en pacientes con HPTP. El hecho de incluir sólo mujeres postmenopáusicas elimina directamente uno de los sesgos más importantes a la hora de interpretar los resultados: la influencia estrogénica en la DMO basal y en su cambio tras el tratamiento quirúrgico. Así mismo, excluir a aquellas pacientes que padezcan alguna enfermedad relacionada con el metabolismo osteo-mineral o que hayan recibido tratamiento con antiresortivos y/u corticoides; convierte nuestra muestra en la cohorte más homogénea, publicada hasta el momento, de pacientes con HPTP sometidas a tratamiento quirúrgico.

1.b- Características densitométricas y analíticas en el momento del diagnóstico

Clásicamente el estudio densitométrico se ha centrado en la medición de la DMO a nivel de columna lumbar y cadera. Dado que el HPTP afecta predominantemente al hueso cortical, desde hace unos años se ha añadido al estudio densitométrico la medición de la DMO a nivel del antebrazo con el objetivo de mejorar la indicación quirúrgica de estos enfermos [Wood y col, 2012]. Dada la estructura y el tipo de hueso, lo esperable es observar una mayor pérdida de masa ósea a nivel del radio (hueso cortical), una pérdida intermedia a nivel de cadera (hueso cortical y trabecular) y una pérdida mucho menor en vértebras (hueso mayoritariamente trabecular) [Silverberg y col, 1989].

Los resultados de la densitometría basal realizada a las pacientes con HPTP (densitometría en el momento del diagnóstico) muestran una prevalencia de osteoporosis del 47,1% a nivel del tercio

proximal de la zona distal del radio, del 43,3% a nivel de columna lumbar y del 26,1% a nivel de cuello femoral (Figura 15). El estudio de Bandeira y col. realizado en 2009, muestra una mayor prevalencia de osteoporosis a nivel del antebrazo (71% de los pacientes asintomáticos) respecto a la prevalencia de osteoporosis en columna lumbar y cuello femoral (48% y 20% respectivamente). Comparativamente, en nuestra serie destaca una prevalencia más baja de osteoporosis a nivel de antebrazo; aunque ésta sigue siendo la localización de mayor afectación ósea si tenemos en cuenta la presencia de osteopenia y osteoporosis (90% a nivel de zona ultradistal del radio y 82,2% a nivel del tercio proximal del extremo distal del radio).

Lo que muestran y confirman claramente los valores obtenidos en la DEXA basal es que la prevalencia de osteoporosis en estas pacientes es mucho mayor que en la población general [Díaz-Curiel y col, 1997; Díaz-Curiel y col, 2001]. Si se compara la prevalencia de osteoporosis entre la población general y las pacientes con HPTP, se observa que estas últimas doblan la prevalencia de osteoporosis a nivel de CL y la cuadruplican a nivel de CF (ANEXO 4 – Figura 1), cosa que ratifica la mayor afectación del hueso cortical en esta enfermedad.

Son muchos los estudios que han asociado la deficiencia de vitamina D con la presencia de un HPTP más severo en forma de mayores niveles de PTH, calcemias más elevadas, mayores adenomas y/o una masa ósea más disminuida [Rao y col, 2000; Moosgaard y col, 2005; Ozbey y col, 2006; Silberberg SJ, 2007; Moosgaard y col, 2008; Mosekilde L, 2008; Jayasena y col, 2013; Tassone y col, 2013]. El 84,51% de las pacientes incluidas en nuestro estudio presentan unos niveles de 25-OH VitD por debajo de los 30ng/ml. Esta es una prevalencia de hipovitaminosis mucho mayor que la descrita en la población general, que según la bibliografía oscila entre el 62% y el 76% [González-Padilla y col 2011; Cutillas-Marco y col, 2012; Quesada-Gómez y col, 2013].

Si se utilizan los criterios propuestos por Lips para definir los estadios de insuficiencia de Vitamina D de nuestra población [Lips y col, 2001]; el 61,3% de las pacientes presentan una deficiencia leve de 25-OH-VitD (valores < 50nmol/L), el 25,4% una deficiencia moderada (valores < 25nmol/L) y el 2,1% una deficiencia severa (valores < 12.5nmol/L). Estos resultados son similares a los obtenidos por Silverberg, Yamashita y Saliba; que encontraron unos niveles de 25-OH VitD inferiores a 50nmol/L en el 53%, 68% y 59,6% de los pacientes afectados de HPTP respectivamente [Silverberg y col, 1999; Yamashita y col, 2002; Saliba y col, 2012]. Sin embargo, son los trabajos de Moosgaard y Boudou los que muestran una prevalencia más elevada de deficiencia de vitamina D en pacientes con HPTP (81% y 90% respectivamente) [Moosgaard y col, 2005; Boudou y col, 2006]. Este aumento de prevalencia podría justificarse por la localización geográfica de la población estudiada (Dinamarca y Norte de Francia). Sin embargo, el trabajo realizado por Nordenström con población sueca, mostró que solo el 39% de los pacientes con HPTP presentaban unos niveles de 25-OH VitD por debajo de 50nmol/L [Nordenström y col, 2004]. Estos estudios ponen de relieve que, además de la exposición a la luz solar, hay otros factores determinantes en el metabolismo de la vitamina D tales como la pigmentación de la piel, el uso de cremas solares, la dieta, las políticas de suplementación, etc [Nordenström y col, 2013; Tassone y col, 2013].

En la actualidad, la razón por la cual los pacientes con HPTP presentan unos niveles más bajos de 25-OH VitD que la población general, presenta todavía varios interrogantes. Se sabe que el exceso de PTH estimula la 1 α -hidroxilasa renal y conduce a un aumento en el metabolismo renal de 25-OH VitD, dando como resultado un aumento de los niveles de 1,25-OH₂ VitD y a una reducción de los niveles de la 25-OH VitD. Sin embargo, teniendo en cuenta la diferencia en la relación molar entre ambas concentraciones plasmáticas (25-OH VitD/1,25-OH₂ VitD: 1000/1) y sus vidas medias, es difícil justificar la hipovitaminosis D con este único factor [Moosgaard y col, 2005]. Así mismo; en presencia de niveles elevados de 1,25-OH₂ VitD se produce un incremento de la expresión del gen 24-hidroxilasa en los tejidos diana de la

vitamina D que conduce a un incremento en la degradación de la 25-OH VitD y la 1,25-OH₂ VitD [Omdahl y col, 2002; Zierold y col, 2003].

La hipercalcemia, el aumento de PTH y los niveles elevados de 1,25-OH₂ VitD presentes en el HPTP, pueden inhibir la producción cutánea de colecalciferol y disminuir la producción hepática de 25-OH VitD [Mosekilde y col, 1989]. Además, un déficit de Vitamina D mantenido puede dar lugar a un hiperparatiroidismo secundario [Sultan y col, 1989; Rao y col, 2000]. Todo ello hace pensar que el aumento de hipovitaminosis D presente en el HPTP puede estar relacionada con un desequilibrio en la autorregulación del eje PTH - Vitamina D.

1.c. Evolución de las variables densitométricas tras intervención quirúrgica:

Desde el 2002, la presencia de osteoporosis en cualquier localización es considerada un criterio de indicación quirúrgica para aquellos pacientes asintomáticos afectos de HPTP (tabla 3). El diagnóstico de osteoporosis se realiza mediante criterios densitométricos (DMO por debajo de -2,5 desviaciones estándar de la media juvenil (T-score < 2,5) en cualquier localización) y/o criterios clínicos (presencia de fractura patológica).

Son múltiples los estudios que han demostrado una mejoría de la DMO tras la realización de una paratiroidectomía [Silverberg y col, 1999; Nakora y col, 2000; Rao y col, 2004; Nordesström y col, 2004; Sitges-Serra y col, 2004; Nomura y col, 2004; Almqvist y col, 2004; Hagström y col, 2006; Ambrogini y col, 2007; Bollerslev y col, 2007; Tamura y col, 2007; Lumachi y col, 2007; Moosgaard y col, 2008; Rubin y col, 2008, Sitges-Serra y col, 2010; Spivacow y col, 2010; Kersch-Schindl y col, 2012; Hansen y col, 2012; Keutgen y col, 2012; Alonso y col, 2012; Koumakis y col, 2013; Rolighed y col, 2013; Neresstedt y col, 2014; Quiriny y col, 2014]. Sin embargo, no todos los estudios han mostrado esta mejoría en todas las localizaciones analizadas. La localización cuyo estudio ha dado lugar a mayores discrepancias en los trabajos publicados hasta el momento ha sido, sin duda, el antebrazo (ANEXO 5 – Tabla 1).

Existen dos factores intrínsecos en estos estudios que dificultan la interpretación y la generalización de sus resultados. El primero es la caracterización de la población estudiada; se trata de estudios que analizan poblaciones pequeñas y muy heterogéneas. El segundo es la variable que se utiliza para estudiar la evolución de la DMO tras la intervención quirúrgica; unos utilizan la T-score, otros la Z-score, otros utilizan el valor absoluto de la DMO en forma de g/cm² y otros analizan el porcentaje de recuperación de masa ósea respecto la DMO basal (ANEXO 5 – Tabla 1).

Una de las fortalezas de nuestro estudio ha sido la inclusión solamente de mujeres postmenopáusicas. De este modo, se ha intentado homogeneizar la muestra y suprimir posibles sesgos hormonales. La segunda, es la utilización de los valores absolutos de DMO (g/cm²) para la realización de todos los cálculos estadísticos; ya que es ampliamente reconocido que esto disminuye posibles errores en la interpretación de los resultados.

Nuestro trabajo muestra un aumento significativo de la DMO tras la cirugía en CL, CF, CT y zona ultradistal del radio (p<0,001 en todas las localizaciones). Este aumento se observa al año de la cirugía y se mantiene a los dos años de seguimiento. Sin embargo, los resultados del estudio del tercio proximal del extremo distal del radio no muestran cambios significativos.

Son múltiples los estudios que han demostrado una mejoría de la DMO tras la cirugía (ANEXO 5 – Tabla 1), con alto nivel de coincidencia en la zona lumbar (lugar que refleja el hueso trabecular) y un bajo nivel de acuerdo en fémur y radio (lugar que representa el hueso cortical). La impresión general que se obtiene tras analizar los resultados de estos estudios es que, a pesar de que el hueso cortical es clásicamente el más afectado por el HPTP, la recuperación de la masa ósea después de la PTx se

produce principalmente en el hueso trabecular. Esta impresión se ve reforzada con los resultados obtenidos en nuestro estudio. La localización con mayor prevalencia de osteoporosis es el antebrazo (45,7% en UD y 47,1% en 1/3 TP), pero al analizar el aumento de la DMO producido tras la PTx, se produce un aumento significativo en todas las localizaciones excepto en la que presenta un mayor porcentaje de hueso cortical, que es el 1/3 proximal de la zona distal del radio [Adami y col, 1998].

En el HPTP el remodelado óseo está aumentado un 50-60% [Mosekilde L, 2008] y la DMO absoluta de estos pacientes se encuentra disminuida. Hay dos aspectos básicos del proceso de remodelación ósea que explican esta situación. En primer lugar, y teniendo en cuenta que la fase de resorción del remodelado óseo es más rápida que la de formación y que estas fases son secuenciales, habrá mucha más superficie de hueso resorbida que todavía no haya iniciado y/o terminado la fase de formación, que superficie remodelada [Eriksen y col, 1986]. En segundo lugar, el hueso nuevo presenta una mineralización más débil que el hueso resorbido [Roschger y col, 2007]. Estas dos situaciones conducen a una disminución reversible de la DMO, ya que una vez disminuye la PTH; la velocidad de remodelado vuelve a la normalidad, los ciclos de resorción-formación finalizan y lentamente, el hueso recién formado aumenta su mineralización. Estos procesos ocurren tanto en el hueso trabecular como en el cortical, por lo que justificarían la recuperación de la DMO tras la cirugía en todas las localizaciones.

En segundo lugar; existen varios estudios que evidencian que el ciclo de remodelado óseo a nivel cortical es más largo que a nivel trabecular [Silverberg y col, 1995; Christiansen y col, 1999; Nomura y col, 2004], y por lo tanto, establecen la idea de que el hueso cortical tarda más en recuperar la DMO tras la PTx que el hueso trabecular. De hecho, el estudio más largo realizado hasta el momento (15 años de seguimiento post PTx) y llevado a cabo por Rubin y colaboradores, observó que el aumento de la DMO a nivel del radio es más lento y progresivo que a nivel de columna y fémur [Rubin y col, 2008]. Es decir, se necesitan estudios más largos para poder valorar correctamente la respuesta del hueso cortical al tratamiento quirúrgico.

1.d-. Predictores demográficos, analíticos y densitométricos en la recuperación de la DMO tras PTx

Para valorar la posible influencia de diferentes parámetros demográficos, analíticos y densitométricos en la recuperación de la DMO tras la PTx se han realizado análisis de regresión lineal uni y multivariante.

Los parámetros demográficos relacionados con el cambio de DMO tras PTx han sido la edad, los años de menopausia y el IMC. El análisis univariante ha demostrado la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la edad y los años de menopausia en el momento del diagnóstico, con la recuperación de la masa ósea tras PTx a nivel de cadera total. Las mujeres más jóvenes y las que presentan una menopausia más tardía han presentado una mayor recuperación de la DMO tras la intervención quirúrgica. Son varios los estudios que han demostrado que los pacientes más jóvenes presentan una mayor recuperación de masa ósea tras la cirugía [Sitges-Serra y col, 2004; Hagström y col, 2006; Sitges-Serra y col, 2010; Dy y col, 2012; Rolighed y col, 2013; Sharma y col, 2014]; y de hecho, una edad de diagnóstico temprana (< 50 años) es un criterio de indicación quirúrgica para los pacientes afectados de HPTP (Tabla 3).

La única referencia en la literatura sobre la menopausia y la evolución de la DMO tras PTx en pacientes con HPTP es el trabajo realizado por Lumachi en 2007. Este estudio comparó la evolución de la DMO tras la PTx entre pacientes pre y postmenopáusicas. Al año de la cirugía, la DMO en columna lumbar mejoró de forma significativa sólo en el grupo de pacientes premenopáusicas [Lumachi y col, 2007]. A pesar de que estos resultados apoyarían nuestros hallazgos, se tiene que reconocer que se trata de un estudio limitado por el pequeño tamaño de la muestra (12 pacientes premenopáusicas y 36 postmenopáusicas) y la presencia de posibles sesgos tales como el estado estrogénico/hormonal y la edad.

El otro parámetro demográfico con un papel importante en la recuperación de la DMO tras la cirugía es el IMC. Éste ha sido, en el análisis multivariante realizado, el único parámetro demográfico relacionado con la recuperación de la DMO tras la cirugía. Un mayor IMC en el momento del diagnóstico se asocia a una mayor recuperación de DMO tras la PTx a nivel de cuello femoral, tendiendo a la significación en el resto de localizaciones estudiadas. El IMC es un factor de riesgo reconocido para la presencia de osteoporosis; un IMC bajo aumenta el riesgo de presentar osteoporosis y también el riesgo de fractura [De Laet y col, 2005]. Moosgaard y colaboradores demostraron en 2008, que la presencia de un IMC bajo se asociaba a una menor DMO a nivel de CL, CF y 1/3 PR en el momento del diagnóstico; aunque no estudiaron su relación con el cambio de DMO tras la PTx [Moosgaard y col, 2008]. Si tenemos en cuenta nuestros resultados y los obtenidos por Moosgaard, se puede concluir que las pacientes con un IMC más bajo presentan una DMO basal más baja y una peor recuperación de la misma tras el tratamiento quirúrgico.

A nivel densitométrico, una DMO baja en el momento del diagnóstico se ha relacionado con un mayor incremento de masa ósea tras la cirugía a nivel de cuello femoral y cadera total, con tendencia a la significación estadística a nivel de columna lumbar. Son múltiples los trabajos publicados que relacionan una mayor afectación ósea en el momento del diagnóstico (ya sea en forma de DMO disminuida, fracturas patológicas previas y/o T-score bajo) con un mayor recuperación de la DMO tras la cirugía [Nakaoka y col, 2000; Sitges-Serra y col, 2004; Almqvist y col, 2004; Dy y col, 2012; Sharma y col, 2014].

Los parámetros analíticos relacionados con el cambio de DMO tras la PTx han sido la PTH basal, su disminución tras la PTx, la 1,25-OH₂ VitD basal y la 25-OH VitD al año de la cirugía. Los niveles elevados de PTH en el momento del diagnóstico se han relacionado con una mayor recuperación de DMO tras la cirugía en todas las localizaciones estudiadas. Así mismo, una mayor disminución de PTH tras la cirugía se ha asociado, de forma estadísticamente significativa, a una mayor recuperación de masa ósea nivel de columna lumbar, cuello femoral y cadera total; tanto en el análisis de regresión lineal univariante como en el multivariante. Son muchos los estudios que han correlacionado la presencia de una PTH elevada en el momento del diagnóstico con una afectación ósea más severa [Sitges-Serra y col, 2004; Rolighed y col, 2013], así como con un mayor aumento de la DMO tras la cirugía [Nakaora y col, 2000; Nomura y col, 2004; Moosgaard y col, 2008; Sitges-Serra y col, 2010; Dy y col, 2012; Norenstedt y col, 20014]. El único estudio hasta el momento que ha asociado el descenso de la PTH tras la cirugía con el aumento de DMO ha sido el realizado por Almqvist en 2004. En dicho estudio no se encontró relación entre la PTH basal y la DMO en el momento del diagnóstico, pero si asoció de forma significativa el descenso de la PTH postPTx con el aumento de DMO a nivel columna lumbar [Almqvist y col, 2004].

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que aquellas mujeres con un HPTP más severo (mayor PTH basal, mayor disminución de PTH tras PTx y menor DMO basal) presentan una mayor recuperación de DMO tras la cirugía. Esta conclusión es reafirmada por la bibliografía publicada hasta el momento.

En cuanto a los metabolitos de la vitamina D, a nivel de cadera total se ha evidenciado una relación estadísticamente significativa entre una 1,25-OH₂ VitD basal elevada y un mayor incremento de la DMO tras la PTx. Así mismo, unos mayores niveles de 25-OH VitD al año de la cirugía se han correlacionado con una mayor recuperación de masa ósea en cuello femoral.

Esta asociación entre la 1,25-OH₂ VitD y el cambio de DMO tras la cirugía ya fue descrita por Nordenström en 2004. Dicho estudio relacionó los niveles elevados de 1,25-OH₂ VitD basal con un mayor aumento de DMO a nivel de cadera total [Nordenström y col, 2004]. Sin embargo, el estudio que muestra mejor la asociación entre los diferentes metabolitos de la vitamina D y la afectación ósea del HPTP es el llevado a cabo por Moosgaard en 2008. En este estudio se relacionó unos niveles elevados de

25-OH VitD en el momento del diagnóstico con una mejor DMO basal en cuello femoral y antebrazo. Así mismo, asoció unos niveles elevados de 1,25-OH₂ VitD con una DMO disminuida a nivel de columna lumbar, cuello femoral y antebrazo. En cuanto a la relación de la Vitamina D y la evolución de la DMO tras PTx sólo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la 1,25-OH₂ VitD y el incremento de DMO a nivel de cuello femoral: a mayor 1,25-OH₂ VitD en el momento del diagnóstico, mejor recuperación de masa ósea a en cuello femoral [Moosgaard y col, 2008]. El único estudio que ha demostrado hasta el momento, una relación estadísticamente significativa entre los niveles de 25-OH VitD basales y la recuperación de masa ósea tras PTx fue el realizado por Dy en 2012. Este trabajo relacionó de forma inversamente proporcional los niveles de 25-OH VitD basales con el aumento de DMO en columna lumbar y cadera total [Dy y col, 2012]. La concordancia en los resultados obtenidos en estos estudios pone de manifiesto la importancia que tiene el status de la vitamina D y sus metabolitos en la afectación ósea presente en el momento del diagnóstico del HPTP, así como en los cambios de DMO que se producen tras el tratamiento quirúrgico.

La asociación directamente proporcional entre la 25-OH VitD al año de la cirugía y la recuperación de masa ósea en cuello femoral, así como la asociación inversamente proporcional entre la ingesta diaria de calcio y el aumento de DMO en cadera total evidenciada en nuestro trabajo; ponen sobre la mesa la posible utilidad de la correcta suplementación con calcio y vitamina D en el HPTP.

El meta-análisis llevado a cabo por Shah en 2013, concluyó que la suplementación con Vitamina D en pacientes con HPTP que presentan concomitantemente un déficit de Vitamina D, es segura. El análisis de los diez trabajos incluidos en el estudio mostró un aumento significativo de los niveles de 25-OH VitD y una disminución significativa de la PTH tras el tratamiento, sin presentar un incremento de la hipercalcemia y/o hipercalcemia respecto a los valores basales. Sólo un 2,2% de los 227 pacientes suplementados estudiados presentaron unos niveles de calcio sérico > 12mg/dl y requirieron de la disminución y/o suspensión de los aportes de Vitamina D. No se reportó ningún caso de crisis hipercalcémica [Shah y col, 2013]. Las últimas guías de actuación establecidas en el cuarto consenso internacional sobre HPTP realizado en 2014, aconsejan la determinación rutinaria de 25-OH VitD en aquellos pacientes diagnosticados de HPTP así como su repleción en caso de hipovitaminosis [Eastell y col, 2014; Marcocci y col, 2014].

En cuanto a la ingesta diaria de calcio recomendada en pacientes con HPTP existe más controversia. Es bien conocido que una dieta pobre en calcio estimula la secreción de PTH, incrementa la síntesis de 1,25-OH₂ VitD y mejora la absorción intestinal de calcio. Así mismo, se ha demostrado que dietas ricas en calcio disminuyen la probabilidad de desarrollar un HPTP [Paik y col, 2012]. En 1997, Locker y colaboradores llevaron a cabo un estudio observacional con 71 pacientes con HPTP en el que no se relacionó de forma estadísticamente significativa la ingesta diaria de calcio con los niveles de PTH, calcemia, fosfatemia, 25-OH VitD, 1,25-OH₂ VitD, calciuria y DMO a nivel de columna lumbar, cuello femoral y tercio distal del radio [Locker y col, 1997]. Sin embargo, la cuestión radica en conocer la seguridad de la suplementación con calcio en pacientes con HPTP. El estudio realizado por Jorde y colaboradores, demostró que los pacientes con HPTP y baja ingesta de calcio (< 450mg/día) no sólo no aumentaban la calcemia ni la calciuria al ser suplementados con 500mg de calcio al día, sino que presentaban una disminución significativa de PTH y una mejoría de la DMO a nivel de cuello femoral [Jorde y col, 2002]. A pesar de ello, se trata de un estudio con una muestra pequeña por lo que sus resultados deben tomarse con cautela.

La asociación entre la baja ingesta del calcio y el aumento de DMO en cadera total tras PTx hallada en este estudio, podría justificarse por una mayor afectación ósea en aquellas mujeres con HPTP y una baja ingesta de calcio. Una dieta pobre en calcio es un factor de riesgo demostrado y reconocido para el desarrollo de osteoporosis, recomendándose una ingesta diaria de 1000-1200mg de calcio como

prevención y tratamiento de la osteoporosis [Martín Jimenez y col, 2015; González-Macías y col, 2015; Tai y col, 2015].

Estudios experimentales han demostrado la necesidad de mantener unos correctos niveles de Vitamina D y unos mínimos aportes de calcio para reducir la resorción e incrementar la masa ósea [Lee y col, 2014]. Considerando todos estos factores, sería razonable suplementar con Vitamina D a aquellas pacientes con HPTP y niveles de 25-OHVit D < 25 nmol/L así como asegurar una ingesta de calcio mínima de 1000mg/día. Sin embargo, no está claro si esta suplementación debería continuarse tras la paratiroidectomía. El estudio realizado por Norenstedt en 2014 intentó resolver esta cuestión. Se realizó un estudio randomizado a doble ciego con 150 pacientes afectos de HPTP y que habían sido sometidos con éxito a una PTx. La mitad de los pacientes fueron suplementados con 1000mg de calcio al día y la otra mitad lo fueron con 1000 mg de calcio al día más 1600UI de colecalciferol al día. En ambos grupos se evidenció un aumento similar de DMO tras la cirugía a nivel de columna lumbar, cuello femoral y cadera total; sin embargo, sólo el grupo suplementado con VitD presentó un incremento significativo de DMO a nivel de radio. Si bien no se pudo demostrar un gran beneficio de la suplementación, tampoco se evidenció un aumento significativo de la calcemia tras la cirugía ni se describió ningún efecto adverso. Sin embargo, es evidente que son necesarios más estudios para poder clarificar los efectos de la suplementación de Vitamina D sobre la masa ósea tras PTx.

1.e-. Limitaciones:

La pérdida del seguimiento de pacientes, sobre todo durante el segundo año, constituye una limitación de este estudio.

De las 159 pacientes incluidas en el estudio, 142 completaron el seguimiento al año de la PTx. Sin embargo, sólo 92 pacientes completaron los dos años de seguimiento. Para valorar la magnitud de esta limitación se ha realizado una prueba de Levene de calidad de varianzas que no ha constatado diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes que han completado el estudio y las pacientes perdidas. Así mismo, no se han evidenciado diferencias estadísticamente significativas entre las variables analíticas y densitométricas al año y a los dos años de la intervención.

Por otro lado, el presente estudio se ha llevado a cabo entre enero del 1999 y diciembre del 2012. A mediados del 2006 se tuvo la posibilidad de añadir al estudio densitométrico la medición de la DMO a nivel del antebrazo, técnica que hasta entonces no se encontraba disponible en nuestro centro. Esta mejora tecnológica ha ofrecido la oportunidad de estudiar mejor el hueso cortical en 70 de las pacientes de la presente cohorte. Sin embargo, este número de pacientes no ha permitido realizar análisis de regresión con suficiente potencia estadística como para obtener resultados significativos.

OBJETIVO: GENOTIPAR LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS DE LOS GENES CANDIDATOS PARA VALORAR SU POSIBLE RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO, SU ASOCIACIÓN CON LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA TRAS PARATIROIDECTOMÍA.

2.a-. Resultado del genotipado de los polimorfismos genéticos estudiados:

Los resultados descritos hasta el momento confirman el daño óseo que se produce en presencia de un HPTP. En la actualidad, este daño óseo se manifiesta mayoritariamente en forma de osteoporosis y/u osteopenia. Así mismo, esta relación entre el HPTP y la masa ósea se ve corroborada al tratar la enfermedad mediante una PTx; ya que al eliminar la producción anómala de PTH se objetiva una mejora de los parámetros densitométricos. Sin embargo, al analizar individualmente cada paciente se observa que esta mejoría no es homogénea ni común en todos los casos. El trabajo realizado por Sitges-Serra en 2010, evidenció que sólo el 46% de las pacientes mostraban un aumento significativo de la DMO tras la cirugía [Sitges-Serra et al, 2010].

La osteoporosis es una enfermedad compleja, multifactorial y multigénica. Son muchos los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y es la combinación de ellos lo que determinará la severidad de la misma y la respuesta al tratamiento. Dentro de estos factores de riesgo, se incluyen variantes genéticas cuya expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes, de factores ambientales y como no, de la presencia de enfermedades concomitantes.

La hipótesis de este trabajo es que hay diversos factores demográficos, analíticos, densitométricos y genéticos, que determinan la evolución de la DMO tras la cirugía en las pacientes afectas de HPTP.

Para estudiar la posible influencia genética en este binomio HPTP-hueso se han seleccionado diferentes polimorfismos en genes candidatos que participan de algún modo en el metabolismo osteo-mineral o en la fisiopatología del HPTP. Los genes candidatos escogidos han sido: el gen del receptor de la vitamina D, el gen del receptor sensor del calcio, el gen del receptor de la PTH, el gen de la OPG, el gen del RANKL, el gen del RANK, el gen de la 25-OH VitD 1-alfa hidroxilasa y el gen del receptor estrogénico 1. Todos ellos han sido relacionados con anterioridad con la osteoporosis, el HPTP y/u otras enfermedades del metabolismo mineral.

A pesar de que ninguno de los genes candidatos ni de los polimorfismos escogidos para su estudio han sido seleccionados al azar, los resultados del análisis estadístico realizado han sido corregidos mediante el método de Bonferroni.

El gen del receptor de la Vitamina D se localiza en el cromosoma 12 y es, a día de hoy, uno de los genes relacionado con la osteoporosis y con el HPTP más estudiados. La principal función biológica de la vitamina D es mantener el calcio sérico en el rango de la normalidad. Este objetivo se consigue a través de dos vías: aumentando la eficiencia de la absorción intestinal de calcio y/o aumentando la actividad osteoclástica del hueso. Estos efectos están mediados por el receptor de la vitamina D. El VDR se trata de un receptor nuclear de transcripción que al unirse a la 1,25-OH₂ VitD y al RXR promueve una cascada de interacciones macromoleculares que conduce, en último lugar, a un aumento o disminución de la transcripción de genes seleccionados. Estos genes de respuesta a la Vitamina D incluyen la proteína de unión al calcio, el canal del calcio epitelial, la 25-OH VitD-24-hidroxilasa, el RANKL, la fosfatasa alcalina, el antígeno específico de próstata y la PTH, entre otros [Holick y col, 2006].

Existen varios estudios sobre la prevalencia de diferentes polimorfismos del VDR en pacientes con HPTP [Carling y col, 1995; Carling, Kindmark y col, 1997; Menárguez y col, 1999; Pacheco y col, 2000; Sosa y col, 2000] y de su asociación con la DMO en el momento del diagnóstico [Kobayashi y col, 1998;

Christensen y col, 2013]. Sin embargo, no hay ninguno que asocie algún polimorfismo del *VDR* con la recuperación de la masa ósea tras la cirugía.

El receptor-sensor del Calcio es otro punto clave en la fisiopatología del HPTP. Este receptor transmembrana se encuentra predominantemente en las células principales de la glándula paratiroidea y es capaz de detectar pequeñas alteraciones en la concentración extracelular del calcio. El aumento del calcio sérico y su unión al CaSR provoca la activación de las fosfolipasa A₂, C y D (produciendo un aumento transitorio del calcio intracelular) e inhibe la adenil ciclasa (provocando una disminución del AMP cíclico). Todas estas reacciones intracelulares tienen como finalidad disminuir la secreción de PTH para intentar mantener una calcemia adecuada [Brown y col, 2006].

Existen varios estudios que asocian diferentes polimorfismos del gen del CaSR con la presencia de litiasis renal en pacientes con HPTP [Corbetta y col, 2006; Vezzoli y col, 2015]. También se ha asociado el polimorfismo rs1042636 (o R990G) del gen del CaSR con la DMO a nivel lumbar [Han y col, 2013] y el polimorfismo rs1801725 (o A986S) del gen del CaSR con el riesgo de fractura [Eller-Vainicher y col, 2014]; sin embargo no hay estudios que valoren la relación entre estos polimorfismos y la evolución de la DMO tras la PTx.

El receptor de la PTH es otro elemento básico en la fisiopatología del HPTP, ya que las acciones biológicas de la PTH están mediadas por esta molécula. El PTHR pertenece a una familia específica de receptores acoplados a la proteína G. Cuando la PTH se une al receptor se activa la proteína Gs que provoca un aumento de la actividad de la adenil ciclasa; el incremento del AMPc secundario aumenta la actividad de la protein quinasa A. Esta cascada de reacciones da como resultado un aumento de la expresión del RANKL, del M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), así como una disminución de la OPG [Kraenzlin y col, 2011].

Existen varios estudios que han relacionado diferentes polimorfismos del *PTH1R* con la DMO [Zhang y col, 2006; Scillitani y col, 2006; Vilariño-Güell y col, 2007], aunque sólo uno lo hace en pacientes con HPTP. En el estudio de Kanzawa se relacionó el polimorfismo del nucleótido 1417 del gen del PTHR1 (sustitución de una citosina por una timina) con la Z-score a nivel de antebrazo. La Z-score a nivel de antebrazo fue significativamente mayor en los pacientes con el genotipo CT y su mejoría tras la PTx fue menor [Kanzawa y col, 1999].

El sistema OPG/RANK/RANKL se ha postulado como el elemento clave en el proceso del remodelado óseo, ya que la gran mayoría de factores reguladores del remodelado actúan aumentando o disminuyendo la producción de la OPG y el RANKL. El RANK es el receptor natural del RANKL y se encuentra en la superficie celular de los osteoclastos y sus precursores. Una vez unido a su receptor, el RANKL estimula la diferenciación y fusión de los preosteoclastos, activa los osteoclastos maduros y evita su apoptosis. La OPG es una proteína soluble que actúa como receptor señuelo del RANKL, impide su unión con el RANK e inhibe así la diferenciación y activación de los osteoclastos.

Varios polimorfismos del *RANK*, *RANKL* y de la *OPG* se han asociado a la DMO [García-Unzueta y col, 2008; Yoskovitz y col, 2013; Shang y col, 2013; Tu y col, 2015]; sin embargo, sólo el trabajo de Piedra y colaboradores, ha estudiado la relación entre diferentes polimorfismos del gen de la OPG y del RANKL con la DMO en pacientes con HPTP [Piedra y col, 2011]. Este estudio encontró una asociación entre el genotipo GG y una menor DMO a nivel de antebrazo para dos polimorfismos del gen de la OPG: el rs3102735 (163A/G) y el rs3134070 (245T/G).

La PTH estimula la 1- α hidroxilasa renal, aumentando la metabolización de la 25-OH VitD hacia la 1,25-OH₂ VitD. Esta última es la forma activa de la vitamina D por lo que la 1- α hidroxilasa renal tiene un papel fundamental en el metabolismo de la Vitamina D, permitiendo llevar a cabo su principal función: mantener el calcio sérico en el rango de la normalidad. Christensen estudió en 2013 la relación entre el

polimorfismo rs1087012 del gen *CYP27B1* y la DMO en el momento del diagnóstico del HPTP. No se encontró asociación entre dicho polimorfismo y DMO en ninguno de los territorios estudiados (columna lumbar, cuello femoral y radio) [Christensen y col, 2013].

El último gen candidato seleccionado para su estudio ha sido el gen del receptor estrogénico alfa (*ESR1*). El déficit estrogénico es un factor de riesgo para la osteoporosis ampliamente reconocido. Son varios los estudios que asocian diferentes polimorfismos del *ESR1* con la DMO [Becherini y col, 2000; van Meurs y col, 2003; Wang y col, 2007], pero sólo Carling ha estudiado estos polimorfismos en el HPTP [Carling, Rastad y col, 1997]. En ese trabajo se genotiparon 101 mujeres postmenopáusicas afectas de HPTP y se observó que aquellas pacientes con el genotipo PP para el polimorfismo Pvu II tenían una menor DMO a nivel de columna lumbar.

Relacionar alguno de los polimorfismos seleccionados con la presencia o no de la enfermedad nos permitiría identificar a las pacientes con mayor riesgo de padecer un HPTP. Así mismo, nos proporcionaría un nuevo elemento de estudio para ahondar en la fisiopatología de la enfermedad y en su evolución.

Conocer si alguno de estos polimorfismos de genes candidatos tiene relación con el daño óseo provocado por el HPTP, nos permitiría identificar las pacientes con mayor riesgo de padecer osteoporosis. Así mismo, saber si alguno de ellos se asocia a una menor recuperación de la DMO tras la cirugía, nos permitiría tratar de antemano a estas pacientes “no respondedoras” y por consiguiente, disminuir el riesgo de fractura.

2.b-. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el hiperparatiroidismo primario:

Para realizar la comparación de prevalencias de los diferentes alelos y genotipos de los polimorfismos estudiados se ha utilizado, como población sana de referencia, la población CEU del PROYECTO GENOMOS 1000. Este proyecto se llevó a cabo entre los años 2008-2015 y tenía como objetivo encontrar la mayoría de variantes genéticas de las poblaciones estudiadas que tuvieran una frecuencia mínima del 1%. De este modo se creó el mayor catálogo público a nivel mundial de genotipos humanos de libre acceso [Auton y col, 2015].

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las pacientes con HPTP tienen una mayor prevalencia de los genotipos A/C para el polimorfismo rs7975232 del gen *VDR* ($p=0,022$) y del genotipo A/A para el polimorfismo rs1042636 del gen *CaSR* ($p=0,048$), con respecto a la población sana. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas si se corrigen los resultados por el método de Bonferroni. A pesar de ello, el hecho de que exista esta tendencia a la significación es muy trascendente, ya que implicaría claramente al gen del *VDR* y del *CaSR* en el proceso del HPTP.

Son varios los estudios de asociación publicados que han relacionado diferentes polimorfismos del receptor de la Vitamina D con la presencia de HPTP [Carling y col, 1995; Carling, Kindmark y col, 1997; Kobayashi y col, 1998; Menárguez y col, 1999; Pacheco y col, 2000; Sosa y col, 2000]. Sin embargo, sólo el realizado por Carling en 1997 incluye dentro de los polimorfismos estudiados el rs7975232 (Apa 1). En dicho estudio se observó que los pacientes con HPTP tenían una prevalencia mayor de los alelos baT para los polimorfismos Bsm 1, Apa 1 y Taq1 del gen del *VDR* en comparación con la población control. Las prevalencias de los diferentes genotipos para el polimorfismo Apa 1 fue: AA 25% / Aa 36% / aa 39% en los pacientes con HPTP y AA 27% / Aa 52% / aa 21% en la población control [Carling, Kindmark y col, 1997]. Las prevalencias de los diferentes genotipos obtenidas por Carling difieren ampliamente con las evidenciadas en este trabajo, tanto a lo que respecta a las pacientes con HPTP como a la población

control (A/A 25,2%, A/C 57,3%, C/C 17,5% para las pacientes con HPTP y A/A 40,4%, A/C 38,4%, C/C 21,2% en la población control). La diferencia entre las prevalencias de los diferentes genotipos del polimorfismo Apa 1, en los pacientes afectados de HPTP, podría justificarse por la heterogenicidad de la población estudiada por Carling. En dicho estudio se incluyeron 254 pacientes con hiperparatiroidismo: 206 con un HPTP (187 mujeres y 19 hombres), 17 con un hiperparatiroidismo asociado a una neoplasia endocrina múltiple (MEN1) y 37 con un hiperparatiroidismo secundario a insuficiencia renal. De hecho, la prevalencia en pacientes con HPTP de los diferentes genotipos del polimorfismo Apa 1 del gen *VDR* observada en este trabajo es similar la referida por Christensen en 2013 (A/A 18%, A/C 61%, C/C 21%) [Christensen y col, 2013]. Así mismo, la diferencia en las prevalencias de los diferentes genotipos en la población control podría atribuirse al origen genético de ambas poblaciones, ya que el estudio de Carling se llevó a cabo en Uppsala, Suecia.

La mayor prevalencia del genotipo A/C para el polimorfismo rs7975232 del gen *VDR* evidenciada en este trabajo y en el de Christensen, sugiere que este receptor puede tener un papel substancial en la fisiopatología del HPTP.

Otro de los genes candidatos relacionados con el HPTP ampliamente estudiado es el gen del *CaSR*. Las prevalencias de genotipos para el polimorfismo rs1042636 del gen del *CaSR* (R990G) halladas en este trabajo han sido del 94,1% para el genotipo AA y 5,9% para el genotipo AG. No se ha encontrado ningún paciente homocigoto para el alelo G. Estas prevalencias son similares a las publicadas con anterioridad por Miedlich (92% AA, 8% AG+GG), Cetani (94,2% AA, 5,8 AG+GG), Scillitani (92% AA, 8% AG+G/G), Eller-Vainicher (AA 94,2%, 8,3% AG+G/G) y Vezzoli (91,2% AA, 8,8% AG) [Miedlich y col, 2001; Cetani y col, 2002; Scillitani y col, 2007; Eller-Vainicher y col, 2014; Vezzoli y col, 2015]. Tres de estos trabajos comparaban estas prevalencias con la población control, y a pesar de que en todos ellos la prevalencia del genotipo AA era mayor en la población con HPTP que en la población control, ninguno de ellos alcanzó la significación estadística [Miedlich y col, 2001; Cetani y col, 2002; Scillitani y col, 2007]. El único estudio publicado cuyos resultados difieren con los hallados en este trabajo es el realizado por Corbetta en 2006; en dicho estudio, la prevalencia del genotipo AA fue del 88,3% en pacientes con HPTP y del 93% en los pacientes control. Tampoco en este caso las diferencias fueron estadísticamente significativas [Corbetta y col, 2016].

El meta-análisis publicado recientemente por Wang, ha asociado el polimorfismo rs 1042636 (R990G) del gen del *CaSR* con el riesgo de padecer un HPTP [Wang y col, 2015].

Los resultados de prevalencia de nuestro trabajo y los estudios publicados hasta el momento, sugieren que el gen del *CaSR* puede tener un papel fundamental en el desarrollo del HPTP.

Es necesaria la realización de nuevos estudios, con muestras de mayor tamaño, para profundizar en el papel de los diferentes polimorfismos del gen *VDR* y del gen *CaSR* en el HPTP.

2.c-. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico:

Han sido varios los estudios publicados hasta el momento que han correlacionado la densidad mineral ósea de los pacientes con HPTP con diferentes polimorfismos de genes candidatos relacionados con el metabolismo osteo-mineral [Carling, Rastad y col, 1997; Kobayashi y col, 1998; Kanzawa y col, 1999; Piedra y col, 2011; Christensen y col, 2013; Han y col, 2013].

En el presente trabajo se ha encontrado una asociación entre la DMO a nivel de columna lumbar y dos polimorfismos relacionados con el sistema OPG/RANK/RANKL. Los análisis de varianza realizados teniendo en cuenta un modelo recesivo, han relacionado el alelo C del polimorfismo rs9594738 del gen

del RANKL y el alelo G del polimorfismo rs1032128 del gen de la OPG con una mayor DMO basal a nivel de columna lumbar ($p=0,029$ y $p=0,020$ respectivamente). Sin embargo, nuevamente, estas diferencias no son estadísticamente significativas si se corrigen los resultados por el método de Bonferroni. A pesar de ello, esta tendencia a la significación reafirma el papel del sistema OPG/RANK/RANKL en todos aquellos procesos en los que existe un aumento de la resorción ósea y en su regulación génica.

Este trabajo no es el primero que relaciona polimorfismos del gen de la OPG con la DMO de los pacientes con HPTP. Piedra y colaboradores publicaron en 2011 un trabajo en el que se analizaba la posible relación entre diferentes polimorfismos del gen de la OPG (rs3102735, rs3134070 y rs2073618) y del RANKL (rs2277438) con la DMO y/o la presencia de fracturas en pacientes afectados de HPTP. En dicho estudio se asoció el alelo G de los polimorfismos rs3102735 y rs3134070 del gen de la OPG con una menor DMO a nivel de tercio distal del radio [Piedra y col, 2011].

Si se considera la ubicación de los polimorfismos que Piedra asoció con la DMO (intrón 1 del gen de la OPG) y el desequilibrio de ligamento de uno de ellos (rs 3134070) con el analizado en nuestro estudio (rs1032128) ($D' 0,999987/r^2 0,165454$), es razonable pensar que estamos delante de un bloque haplotípico con potencial influencia en el desarrollo de osteoporosis en pacientes con HPTP. En este sentido, es necesaria la realización de nuevos estudios, tanto de asociación como de funcionalidad, para aclarar el papel de dichos polimorfismos en el HPTP.

Carling relacionó el polimorfismo Pvu II del gen del ESR1 con la DMO a nivel de columna lumbar en pacientes con HPTP [Carling, Rastad y col, 1997], Kanzawa asoció la presencia del genotipo CC en la posición 1417 del gen del PTHR con una menor DMO a nivel de radio [Kanzawa y col, 1999], Kobayasi relacionó el polimorfismo Bsm I del gen del VDR con la DMO a nivel de antebrazo [Kobayashi y col, 1998], Christensen relacionó otro polimorfismo del gen del VDR, el Apa I, con la DMO a nivel de columna lumbar [Christensen y col, 2013] y Han vinculó el polimorfismo R990G del gen del CaSR con la DMO en columna lumbar [Han y col, 2013]. Sin embargo, ninguno de los polimorfismos del gen del VDR, del PTHR, del ER1 y del CaSR escogidos para su análisis en el presente estudio, se han relacionado con la DMO basal en ninguna de las localizaciones estudiadas.

2.d-. Estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y el cambio de DMO post paratiroidectomía:

De todos los polimorfismos analizados en el presente trabajo, sólo el polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1* se ha relacionado con el cambio de DMO tras la PTx a nivel de cadera total ($p=0,023$). Al realizar el análisis mediante un modelo recesivo, la presencia del alelo G se ha asociado a una mayor recuperación de la DMO tras la cirugía ($p=0,006$) rozando la significación estadística tras corregir los resultados por el método de Bonferroni.

Dicho polimorfismo ya se había relacionado con el riesgo de fractura en ancianos [Clifton-Bligh y col, 2011] y con los niveles de 25-OH Vitamina D circulantes [Orton y col, 2008]; sin embargo, es la primera vez que se relaciona con el HPTP y con la recuperación de la DMO tras el tratamiento quirúrgico.

Si se tienen en cuenta las concentraciones de 25-OH VitD y de 1,25-OH₂ VitD asociadas al alelo G del polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1*, en un modelo de análisis recesivo; se observa que las pacientes con dicho alelo tienen una concentración menor de 25-OH VitD y una concentración mayor de 1,25-OH₂ VitD que las pacientes con alelo A. A pesar de que estas diferencias no son estadísticamente significativas, nos sugieren que dicho alelo puede repercutir en la funcionalidad de la 1- α -hidroxilasa renal y en consecuencia, en la severidad del HPTP. En ese sentido, es necesaria la realización de nuevos

estudios de expresión y funcionalidad de dicho polimorfismo para confirmar lo que sugieren estos resultados.

El polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1* sería el segundo polimorfismo relacionado con la recuperación de la DMO tras la PTx encontrado hasta el momento. Revisada la bibliografía de la que se dispone en la actualidad, solo el trabajo publicado por Kanzawa en 1999 ha relacionado un polimorfismo genético con la recuperación de la DMO tras PTx en pacientes con HPTP. En dicho estudio, el genotipo CT del polimorfismo situado en la posición 1417 del gen del PTHR se asoció con una menor recuperación de la DMO a nivel de radio [Kanzawa y col, 1999]. Ninguno de los tres polimorfismos del gen del PTHR analizados en el presente estudio se ha relacionado con el cambio de DMO tras PTx en ninguna de las localizaciones estudiadas.

Del resto de polimorfismos analizados hay dos que requieren una mención especial: el polimorfismo rs2504063 del gen *ESR1* y el rs9594738 del gen *RANKL*. Ambos han rozado la significación estadística cuando se ha analizado su relación con la recuperación de la DMO tras el tratamiento quirúrgico. El polimorfismo rs2504063 del gen *ESR1* se ha relacionado con el cambio de DMO tras PTx a nivel de cadera total ($p=0,063$ para el modelo dominante) y el polimorfismo rs9594738 del gen *RANKL* se ha asociado con el aumento de DMO a nivel de cuello femoral ($p=0,073$ para el modelo dominante) y zona ultradistal del radio ($p=0,051$ para el modelo recesivo). Teniendo en cuenta estos resultados, es razonable considerar a dichos polimorfismos unos candidatos ideales para realizar futuros estudios de asociación.

2.e-. Limitaciones:

El tamaño muestral y el número de polimorfismos estudiados en el presente trabajo son dos posibles limitaciones desde un punto de vista genético.

Por problemas logísticos, solo se han genotipado 104 de las 159 pacientes incluidas en el estudio. Para valorar el alcance de dicha pérdida, se ha realizado una prueba de Levene de calidad de varianzas que no muestra diferencias significativas entre la población de la que se dispone de muestra para genética y la población perdida.

La selección de 13 polimorfismos para su genotipado y estudio ha condicionado que, tras corregir los resultados alcanzados mediante el método de Bonferroni, se requieran valores de $p < 0,004$ para alcanzar la significación estadística. La aplicación de este factor de corrección es indiscutible en estudios de asociación a gran escala (GWAS); sin embargo, ninguno de los polimorfismos estudiados en el presente trabajo ha sido elegido al azar y todos ellos se han relacionado anteriormente con la osteoporosis, el HPTP y/u otras enfermedades del metabolismo mineral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. La prevalencia de osteoporosis es mucho mayor en mujeres con HPTP que en la población general y el tipo de hueso más afectado es el hueso cortical. El antebrazo, zona de mayor porcentaje de hueso cortical, es la localización con mayor afectación ósea en el HPTP (el 90% de las pacientes con HPTP presenta osteopenia y/u osteoporosis a nivel de la zona ultradistal del radio). La prevalencia de osteoporosis en mujeres con HPTP cuadruplica a la de la población general a nivel de cuello femoral (presencia de hueso cortical y trabecular) y la duplica a nivel de columna lumbar (hueso mayoritariamente trabecular).
2. La Densidad Mineral Ósea en las pacientes con HPTP aumenta de forma significativa tras tratamiento quirúrgico a nivel de columna lumbar, cuello femoral, cadera total y zona ultradistal del radio. Este aumento se observa al año de la cirugía y se mantiene a los dos años de seguimiento. Es necesaria la realización de estudios más largos para encontrar cambios significativos de la DMO a nivel del tercio proximal del extremo distal del radio.
3. Las mujeres más jóvenes y las que presentan una menopausia más tardía presentan un mayor incremento de DMO a nivel de cadera total tras el tratamiento quirúrgico. La presencia de un IMC elevado se relaciona con una mayor recuperación de DMO a nivel de cuello femoral, existiendo una tendencia a la significación estadística en el resto de localizaciones analizadas.
4. Las pacientes con un HPTP más severo, en forma de mayor PTH basal, mayor disminución de PTH tras la PTx, mayor 1,25-OH₂ VitD basal o menor DMO basal, presentan una mayor recuperación de DMO tras la cirugía. Unos niveles elevados de PTH en el momento del diagnóstico, así como su mayor disminución tras la cirugía, se relacionan con un aumento más marcado de la DMO en todas las localizaciones estudiadas. Una 1,25-OH₂ Vitamina D basal elevada se asocia a un mayor incremento de DMO a nivel de cadera total. Una DMO baja en el momento del diagnóstico se asocia a un mayor incremento de masa ósea tras PTx a nivel de cuello femoral y cadera total.
5. La prevalencia de déficit de Vitamina D es mayor en las mujeres con HPTP que en la población general. La asociación directamente proporcional entre la 25-OH VitD al año de la cirugía y la recuperación de la masa ósea en cuello femoral evidenciada en el presente estudio, pone de manifiesto la importancia de la correcta suplementación con Vitamina D en los pacientes con HPTP.
6. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la población general y las pacientes con HPTP respecto a la prevalencia de los diferentes genotipos para los polimorfismos estudiados. Existen dos polimorfismos con tendencia a la significación: el genotipo A/C para el polimorfismo rs7975232 del gen *VDR* ($p=0,022$) y el genotipo A/A para el polimorfismo rs1042636 del gen *CaSR* ($p=0,048$) que se presentan con mayor frecuencia en pacientes con HPTP.
7. No se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes polimorfismos estudiados y la DMO en el momento del diagnóstico en ninguna de las localizaciones estudiadas. Sin embargo, dos polimorfismos relacionados con el sistema

OPG/RANK/RANKL han mostrado una tendencia a la significación al realizar los análisis mediante un modelo recesivo. El alelo C del polimorfismo rs9594738 del gen *RANKL* y el alelo G del polimorfismo rs1032128 del gen *OPG* se han relacionado con una mayor DMO basal a nivel de columna lumbar ($p=0,029$ y $p=0,020$ respectivamente).

8. No se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre los diferentes polimorfismos estudiados y la evolución de la DMO tras el tratamiento quirúrgico. Sin embargo, el polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1* ha rozado la significación estadística una vez corregidos los resultados por el método de Bonferroni. El modelo recesivo muestra que la presencia del alelo G se asocia a una mayor recuperación de la DMO a nivel de cadera total ($p=0,006$).
9. El polimorfismo rs9594738 del gen *RANKL*, el polimorfismo rs1032128 del gen *OPG*, el polimorfismo rs2504063 del gen *ESR1* y el polimorfismo rs4646536 del gen *CYP27B1* son candidatos ideales para futuros estudios que intenten esclarecer el papel de la genética en el daño óseo provocado por el HPTP.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

A

Adami S, Braga V, Squaranti R, Rossini M, Gatti D, Zamberlan N. Bone measurements in asymptomatic Primary Hyperparathyroidism. *Bone*. 1998; 22(5): 565-570

Adami S, Marconi C, Gatti D. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Europe. *J Bone Miner Res* 2002; 17:18-23

Almqvist EG, Becker C, Bondeson AG, Bondeson L, Svensson J. Early parathyroidectomy increases bone mineral density in patients with mild primary hyperparathyroidism: A prospective and randomized study. *Surgery*. 2004; 136 (6): 1281-8

Alonso S, Ferrero E, Donat M, Martínez G, Vargas C, Hidalgo M, Moreno E. The usefulness of high pre-operative levels of serum type I collagen bone markers for the prediction of changes in bone mineral density after parathyroidectomy. *J Endocrinol Invest*. 2012; 35: 640-644

Ambrogini E, Cetani F, Cianferotti L, Vignali E, Banti C, Viccica G, Oppo A, Miccoli P, Berti P, Bilezikian JP, Pinchera A and Marcocci C. Surgery or surveillance for mild asymptomatic primary hyperparathyroidism: a prospective, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(8): 3114-3121

Arbolea L, Castañeda S. Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatol Clin*. 2013; 9(5): 303-315

Au WY. Inhibition by 1,25 dihydroxycholecalciferol of hormonal secretion of rat parathyroid gland in organ culture. *Calcif Tissue Int*. 1984; 36(4): 384-91

Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526 (7571): 67-74

B

Bandeira F, Griz LH, Bandeira C, Pinho J, Lucena CS, Alencar C, Thé AC and Diniz ET. Prevalence of cortical osteoporosis in mild and severe primary hyperparathyroidism and its relationship with bone markers and vitamin D status. *J Clin Densitom* 2009; 12: 195-9

Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, Falchetti A, Gonnelli S, Fiorelli G, Tanini A, Brandi ML. Evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms in the human receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(13): 2043-50

Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marocci C, Potts JT. Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(10): 3561-3569

Bilezikian JP, Khan AA and Potts JT. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Summary statement from the third international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 335-339

Bilezikian JP, Potts JT, Fuleihan GEH, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, Rastad J, Silverberg SJ, Udelsman R, Wells SA. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: A perspective for the 21st century. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 5353-5361

Bollerslev J, Jansson S, Mollerup CL, Nordenström J, Lundgren E, Topping O, Varhaug JE, Baranowski M, Aanderud S, Franco C, Freyschuss B, Isaksen GA, Ueland T and Rosen T. Medical observation, compared with parathyroidectomy, for asymptomatic primary hyperparathyroidism: a prospective, randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(5): 1687-1692

Boudou P, Ibrahim F, Cormier C, Sarfati E, Souberbielle JC. A very high incidence of low 25 hydroxy-vitamin D serum concentration in a French population of patients with primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest.* 2006; 29(6): 511-5

Brown EM, Jüppner H. Hormona paratiroidea: síntesis, secreción y acción. En: Favus MJ (eds). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 6th ed. Medical Trends, Barcelona, Spain. 2006. Pag 110-121

Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 2001; 81(1): 239-297

Brown EM, Pollak M, Choy YH, Seidman CE; Seidman JG, Hebert SC. Cloning and functional characterization of extracellular Ca(2+)-sensing receptors from parathyroid and kidney. *Bone.* 1995; 17(2 Suppl): 7S-11S

Brown JP, Josse RG; Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of Canada. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ* 2002; 167:S1-34.

C Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* 1989; 83(1): 60-65

Carling T, Kindmark A, Hellman P, Holmberg L, Akerström G, Rastad J. Vitamin D receptor Alleles b, a and T: Risk factors for sporadic primary hyperparathyroidism but not HPT or uremia or MEN1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231 (2): 329-32

Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G, Melhus H. Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat Med* 1995; 1(12):1309-11

Carling T, Rastad J, Kindmark A, Lundgren E, Ljunghall S, Akerström G. Estrogen receptor gene polymorphism in postmenopausal primary hyperparathyroidism. *Surgery.* 1997; 122(6): 1101-5

Carling T, Ridefelt P, Ellman P, Rastad J, Akerström G. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1772-5

Cetani F, Borsari S, Vignali E, Pardi E, Picone A, Cianferotti L, Rossi G, Miccoli P, Pinchera A, Marocci C. Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25: 614-619

Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem.* 2003; 88(4): 695-705

Christensen M, Apalset EM, Nordbo Y, Varhaug JE, Mellgren G, Lien EA. 1,25-Dihydroxyvitamin D and the vitamin D receptor gene polymorphism Apa1 influence bone mineral density in primary hyperparathyroidism. *PLoS One.* 2013;8(2):e56019. doi: 10.1371/journal.pone.0056019. Epub 2013 Feb 13.

Christiansen P, Steiniche T, Brixen K, Hesse I, Melsen F, Heickendorff L, Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy on regional bone mineral density in Danish patients: a three-year follow-up study. *Bone*. 1999; 25(5): 589-595

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3 Suppl 3: S131-9

Clifton-Bligh RJ, Nguyen TV, Au A, Bullock M, Cameron I, Cumming R, Chen JS, March LM, Seibel MJ, Sambrook PN. Contribution of a common variant in the promoter or the 1- α -hydroxylase gene (CYP27B1) to fracture risk in the elderly. *Calcif Tissue Int*. 2011; 88:109-116.

Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, Saeli P, Vezzoli G, Arcidiacono T, Loli P, Syren ML, Soldati L, Beck-Peccoz P, Spada A. R990G polymorphism of the calcium-sensings receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2006; 155(5):687-92.

Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. Risk factors for hip fracture in White women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med*. 1995; 332 (12): 767-773

Cutillas-Marco E, Fuertes-Prosper A, Grant WB, Morales-Suárez-Vareia M. Vitamin D deficiency in South Europe: effect of smoking and aging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2012; 28:159-161

D De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ3rd, Meunier PJ, Pols HA, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005; 16(11): 1330-8

Defetos LJ. Calcitonina. En: Favus MJ (eds). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 6th ed. Medical Trends, Barcelona, Spain. 2006. Pag 141-144

Díaz Curiel M, Carrasco de la Peña JL, Honorato Perez J, Perez Cano R, Rapado A, Ruiz Martinez I. Study of Bone Mineral Density in Lumbar Spine and Femoral Neck in a Spanish Population. Multicentre Research Project on Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 1997; 7: 59-64

Díaz Curiel M, García JJ, Carrasco JL, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A, Álvarez Sanz C. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 86-88

Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3632-8

Dy BM, Grant CS, Wermers RA, Kearns AE, Heubner M, Harmsen WS, Thompson GB, Farley DR, Richards ML. Changes in bone mineral density after surgical intervention for primary hyperparathyroidism. *Surgery*. 2012; 152: 1051-58

E Eastel R, Brandi ML, Costa AG, D'Amour P, Shoback DM, Rhakker RV. Diagnosis of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Proceedings of the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(10): 3570-3579

Eller-Vainicher C, Battista C, Guarnieri V, Muscarella S, Palmieri S, Salcuni AS, Guglielmi G, Corbetta S, Minisola S, Spada A, Hendy GN, Cole DE, Chiodini I, Scillitani A. Factors associated with vertebral fracture risk in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. 201; 171 (3): 399-406

Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone*. 1986; 7: 213-221.

Evans RA, Marel GM, Lancaster EK, Kos S, Evans M, Wong SYP. Bone mass in low relatives of osteoporotic patients. *Ann Int Med*. 1988; 109: 870-873

F Fang Y, van Meurs JBJ, d'Alesio A, JZhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JPT, Jehan F, Pols HAP, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-Untranslated-Region Haplotypes in the Vitamin D Receptor Gene Predispose to Osteoporotic Fracture: The Rotterdam Study. *Am J Hum Genet*. 2005; 77: 807-823

G García-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, Sañudo C, Berja A, Valero C, Pesquera C, Paule B, González-Macías J, Amado JA. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res*. 2008; 40(3): 219-24

González-Macías J, Del Pino-Montes J, Olmos JM, Nogués X, en nombre de la Comisión de Redacción de las Guías de Osteoporosis de la SEIOMM. Clinical practice guidelines for postmenopausal, glucocorticoid-induced and male osteoporosis. Spanish Society for Research on Bone and Mineral Metabolism (3rd updated versión 2014). *Rev Clin Esp*. 2015; 215(9): 515-526

González-Padilla E, Soria López A, González-Rodríguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco MdelV, Saavedar P, Quesada Gómez JM, Sosa Henríquez M. High prevalence of hypovitaminosis D in medical students in Gran Canaria, Canary Islands (Spain). *Endocrinología y Nutrición*. 2011; 58: 267-73

Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet*. 1996; 14 (2): 203-205

Griebeler ML, Kearns AR, Ryu E, Hathcock MA, Melton LJ 3rd, Wermers RA. Secular trends in the incidence of primary hyperparathyroidism over five decades (1965-2010). *Bone*. 2015; 73:1-7

Hagström E, Lundgren E, Mallmin H, Rastad J and Hellman P. Positive effect of parathyroidectomy on bone mineral density in mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Intern Med*. 2006; 259(2): 191-198

H Han G, Wang O, Nie M, Zhu Y, Meng X, Hu Y, Liu H, Xing X. Clinical phenotypes of chinese primary hyperparathyroidism patients are associated with the calcium-sensing receptor gene R990G polymorphism. *Eur J Endocrinol* 2013; 169: 629-638

Hansen S, Hauge EM, Rasmussen L, Jensen JE, Brixen K. Parathyroidectomy improves bone geometry and microarchitecture in female patients with primary hyperparathyroidism: a one-year prospective controlled study using high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(5):1150-8

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998; 13(3): 325-49

Holick MF, Garabedian M. Vitamina D: fotobiología, metabolismo, mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. En: Favus MJ (eds). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 6th ed. Medical Trends, Barcelona, Spain. 2006. Pag 131-140

Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(3): 362-71

I Ioannidis JP, Ralston SH, Bennet ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, MacGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG; GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*. 2004; 292 (17): 2105-2114

J Jayasena CN, Modi M, Palazzo F, De Silva A, Donaldson M, Meeran K, Dhillon WS. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with circulating PTH, phosphate and calcium in patients with primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology*. 2013; 78: 838-43

Jilka RL, O'Brien CA, Ali AA, Roverson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. *Bone*. 2009; 44: 275-86

Jorde R, Szumilas K, Haug E, Sundsfjord J. The effects of calcium supplementation to patients with primary hyperparathyroidism and a low calcium intake. *Eur J Nutr*. 2002; 41: 258-263

K Kanzawa M, Sugimoto T, Kobayashi T, Kobayashi A, Chihara K. Association between parathyroid hormone (PTH)/PTH-Related peptide receptor gene polymorphism and the extent of bone mass reduction in primary hyperparathyroidism. *Horm Metab Res*. 2000; 32:355-358.

Kerschman-Schindl K, Riss P, Krestan C, Rauner M, Bieglmayer C, Gleiss A, Fialka-Moser V, Niederle B, Pietschmann P. Bone metabolism in patients with primary hyperparathyroidism before and after surgery. *Horm Metab Res*. 2012; 44(6): 476-81

Keutgen XM, Buitrago D, Filicori F, Kundel A, Elemento O, Fahey TJ 3rd, Zarnegar R. Calcimimetics versus parathyroidectomy for treatment of primary hyperparathyroidism: retrospective chart analysis of a prospective database. *Ann Surg*. 2012; 255(5): 981-5

Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis Prevention, Screening and Treatment; A Review. *J Womens Health*. 2014; 23(7): 563-572

Kobayashi T, Sugimoto T, Kobayashi A, Chihara K. Vitamin D receptor genotype is associated with cortical bone loss in Japanese patients with primary hyperparathyroidism. *Endocr J* 1998; 45 (1): 123-25

Koumakis E, Souberbielle JC, Sarfati E, Meunier M, Maury E, Gallimard E, Borderie D, Kahan A, Cormier C. Bone Mineral Density Evolution After Successful Parathyroidectomy in Patients With Normocalcemic Primary Hyperparathyroidism. *J Clin EndocrinolMetab*. 2013; 98(8): 3213-3220

Kraenzlin ME, Meier C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 7(11): 647-56

L

Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF: Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis. *Bone*. 2003; 32 (3):297-310

Lee AM, Sawyer RK, Moore AJ, Morris HA, O'Loughlin PD, Anderson PH. Adequate dietary vitamin D and calcium are both required to reduce bone turnover and increased bone mineral volumen. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 144 Pt A: 159-62

Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*. 2001; 22: 477-501

Liu YJ, Zhang L, Papasian CJ, Deng HW. Genome-Wide Association Studies for Osteoporosis: A 2013 Update. *J Bone Metab* 2014; 21: 99-116

Locker FG, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Optimal dietary calcium intake in primary hyperparathyroidism. *Am J Med*. 1997; 102: 543-550

Lowe H, McMahon J, Rubin R, Bilezikian JP, Silverberg SJ. Normocalcemic Primary Hyperparathyroidism: Further Characterization of a New Clinical Phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(8): 3001-3005

Lumachi F, Camozzi V, Ermani M, de Lotto F and Luisetto G. Bone mineral density improvement after successful parathyroidectomy in pre- and postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1117: 357-361

M

Marcocci C, Bollerslev J, Khan AA, Shoback DM. Medical Management of Primary Hyperparathyroidism: Proceedings of the Fourth International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(10): 3607-3618

Martín Jiménez JA, Consuegra Moya B, Marín Jiménez MT. Nutritional factors in preventing osteoporosis. *Nutr Hosp*. 2015; 32 Suppl 1: 49-55

Martínez Díaz-Guerra G, Jodar Gimeno E, Reyes García R, Gomez Saez JM, Muñoz-Torres M. Hiperparatiroidismo primario normocalcémico: recomendaciones acerca del manejo y seguimiento. *Endocrinol Nutr*. 2013; 60(8): 456.e1-456.e6

Menárguez J, Goicoechea M, Crist bal E, Arribas B, Martínez ME, Alcázar JA, Carri R, Polo JR. Lack of relationship between Bsm1 vitamin D receptor polymorphism and primary hyperparathyroidism in a Spanish female population. *Calcif Tissue Int*. 1999; 65 (3): 214-216

Mihai R, Wass JA, Sadler GP. Asymptomatic hyperparathyroidism – need for multicentre studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 155-164

Moosgaard B, Christensen SE, Vestergaard P, Heickendorff L, Christiansen P, Mosekilde L. Vitamin D metabolites and skeletal consequences in primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2008; 68(5): 707-15

Moosgaard B, Vestergaard P, Heickendorff L, Melsen F, Christiansen P, Mosekilde L. Vitamin D status, seasonal variations, parathyroid adenoma weight and bone mineral density in primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology*. 2005; 63: 506-513

Mosekilde L, Charles P, Lindegreen P. Determinants for serum 1,25-dihydroxycholecalciferol in primary hyperparathyroidism. *Bone and Mineral*. 1989; 5: 279-290

Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69(1): 1-19

N Nakaoka D, Sugimoto T, Kobayashi T, Yamaguchi T, Kobayashi A and Chihara K. Prediction of bone mass change after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85 (5): 1901-07

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001; 344 :1434-41

Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Fil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2011; 32: 105-112

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis, Prevention, Diagnosis and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA.* 2001; 285: 786-95

Nomura R, Sugimoto T, Tsukamoto T, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Yamaguchi T, Kobayashi A, Chihara K. Marked and sustained increase in bone mineral density after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism; a six-year longitudinal study with or without parathyroidectomy in Japanese population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 60(3): 335-42

Nomura R, Sugimoto T, Tsukamoto T, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Yamaguchi T, Kobayashi A, Chihara K. Marked and sustained increase in bone mineral density after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism; a six-year longitudinal study with or without parathyroidectomy in Japanese population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 60(3): 335-42

Nordenström E, Sitges-Serra A, Sancho JJ, Thier M, Almquist M. Vitamin D status in patients operated for primary hyperparathyroidism: comparison of patients from southern and northern Europe. *Int J Endocrinol.* 2013:164939. doi: 10.1155/2013/164939. Epub 2013 Aug 5

Nordenström E, Westerdahl J, Bergenfelz A. Recovery of bone mineral density in 126 patients after surgery for primary hyperparathyroidism. *World J Surg.* 2004; 28(5): 502-7

Norenstedt S, Pernow Y, Zedenius J, Nordenström J, Sääf M, Granath F, Nilsson IL. Vitamin D supplementation after parathyroidectomy: effect on bone mineral density – a randomized double-blind study. *J Bone Miner Res.* 2014; 29(4):960-967

O Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annual Review of Nutrition.* 2002; 22:139-166

Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, Vieth R, Sadovnick AD, Ebers GC. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(2):441-7

Ozbey N, Erbil Y, Ademoglu E, Ozarmagan S, Barbaros U, Bozbora A. Correlations between vitamin D status and biochemical/clinical and pathological parameters in primary hyperparathyroidism. *World Journal of Surgery:* 2006; 30: 321-326

P Pacheco D, Menárguez J, Cristobal E, Arribas B, Alcazar JA, Carrión R, Polo JR. Bsm1 vitamin D receptor polymorphism and pathogenesis of parathyroid adenoma. *Med Sci Monit* 2000; 6(4):658-660

Paik JM, Curhan GC, Taulor EN. Calcium intake and risk of primary hyperparathyroidism in women: prospective cohort study. *BMJ*. 2012;234:e6390

Pérez-Edo y col. Actualización 2011 del consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre la osteoporosis. *Reumatol Clin*. 2011; 7(6): 357-379

Piedra M, García-Unzueta MT, Berja A, Paule B, Lavín BA, Valero C, Riancho JA, Amado JA. Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. *BMC Med Genet*. 2011; 12: 168

Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987; 80: 706-710

Q Quesada-Gómez JM, Diaz-Curiel M, Sosa-Henriquez M, Malouf-Sierra J, Nogues-Solan X, Gomez-Alonso C, Rodriguez-Mañas L, Neyro-Bilbao JL, Cortes X, Delgado J. Low calcium intake and inadequate vitamin D status in postmenopausal osteoporotic women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2013; 13: 6175-7

Quiriny M, Moreau M, Alexiou J, Andry G. Parathyroidectomy in Primary Hyperparathyroidism: Retrospective Study of 167 patients, Experience in Jules Bordet Institute. *Acta Chir Belg*. 2014; 114: 118-124

R Rao DS, Honasoge M, Dewine GW, Phillips ER, Lee MW, Ansari MR, Talpos GB, Parfitt AM. Effect of vitamin D nutrition on parathyroid adenoma Weight: pathogenic and clinical implications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 88: 1054-1058

Rao DS, Phillips ER, Divine GW and Talpos GB. Randomized controlled clinical trial of surgery versus no surgery in patients with mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(11): 5415-5422

Reyes Garcia R, Rozas Moreno P, Muñoz-Torres M. Regulación del proceso de remodelado óseo. *REEMO* 2008; 17(1): 10-14

Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet*. 2012; 13(8): 576-588

Rolighed L, Vestergaard P, Heickendorff L, Sikjaer T, Rejnmark L, Mosekilde L, Christiansen P. BMD improvements after operation for primary hyperparathyroidism. *Langenbecks Arch Surg*. 2013; 398: 113-120

Romero Barco CM, Manrique Arijia S, Rodríguez Pérez M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatol Clin*. 2012; 8(2):149-152

Roschger P, Dempster DW, Zhou H, Paschalis EP, Silverberg SJ, Shane E, Bilezikian JP and Klaushofer K. New observations on bone quality in mild primary hyperparathyroidism as determined by quantitative backscattered electron imaging. *J Bone Miner Res*. 2007; 22: 717-723

Rubin MR, Bilezikian JP, McMahon DJ, Jacobs T, Shane E, Siris E, Udesky J and Silverberg SJ. The natural history of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery after 15 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(9):3462-3470

Rubin MR, Bilezikian JP, McMahon DJ, Jacobs T, Shane E, Siris E, Udesky J and Silverberg SJ. The natural history of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery after 15 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(9):3462-3470

S Saliba W, Lavi I, Rennert HS, Rennert G. Vitamin D status in primary hyperparathyroidism. *European Journal of Internal Medicine.* 2012; 23: 88-92

Sands JM, Naruse M, Baum M, Jo I, Hebert SC, Brown EM, Harris HW. Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest.* 1997; 99(6): 1399-405

Sankaran S, Gamble G, Bolland M, Reid IR, Grey A. Skeletal effects of interventions in mild primary hyperparathyroidism: A meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1653-1662

Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, De Geronimo S, Muscarella LA, Chiodini I, Cignarelli M, Minisola S, Bertoldo F, Francucci CM, Malavolta N, Piovesan A, Mascia ML, Muscarella S, Hendy GN. Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 277-283

Scillitani A, Jang C, Wong BY, Hendy GN, Code DE. A functional polymorphism in the PTHR1 promoter region is associated with adult height and BMD measured at the femoral neck in a large cohort of young Caucasian women. *Hum Genet.* 2006; 199(4): 416-21

Seeman E, Hopper JL, Bach LA, Cooper ME, Parkinson E, McKay J, Jeremus G. Reduced bone mass in daughter of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989; 320:554-558

Shah VN, Shah CS, Bhadada SK, Rao DS. Effect of 25(OH)D replacements in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT) and coexistent vitamin D deficiency on serum 25(OH)D, calcium and PTH levels: a meta-analysis and review of literature. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014; 80(6): 797-803

Shang M, Lin L, Cui H. Association of genetic polymorphisms of RANK, RANKL and OPG with bone mineral density in Chinese peri- and postmenopausal women. *Clin Biochem.* 2013; 46(15): 1493-501

Sharma J, Itum DS, Moss L, Chun-Li C, Weber C. Predictors of bone mineral density improvement in patients undergoing parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. *World J Surg.* 2014; 38: 1268-1273

Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest.* 2001; 34(10): 801-810

Silverberg SJ, Clarke BL, Peacock M, Bandeira F, Boutroy S, Cusano NE, Dempster D, Lewiecki M, Liu JM, Minisola S, Rejnmark L, Silva BC, Walker MD, Bilezikian JP. Current Issues in the Presentation of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Proceedings of the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(10): 3580-3594

Silverberg SJ, Gartenberg F, Jacobs TP, Shane E, Siris E, Staron RB, McMahon DJ, Bilezikian JP. Increased bone mineral density after parathyroidectomy in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(3): 729-734

Silverberg SJ, Shane E, de la Cruz L, Dempster DW, Feldman F, Seldin D, Jacobs TP, Siris ES, Cafferty M, Parisien MV, Lindsay R, Clemens TL, Bilezikian JP. Skeletal disease in primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 1989; 4(3): 283-91

Silverberg SJ, Shane E, Dempster DW, Bilezikian JP. The effects of vitamin D insufficiency in patients with primary hyperparathyroidism. *American Journal of Medicine*. 1999; 107: 561-7

Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris E and Bilezikian JP. A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *N Engl J Med*. 1999; 341(17): 1249-1255

Silverberg SJ. Vitamin D deficiency and primary hyperparathyroidism. *Journal of Bone Mineral Research*. 2007; 22: V100-4

Sitges-Serra A, Garcia L, Prieto R, Peña MJ, Nogués X, Sancho JJ. Effect of parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism on bone mineral density in postmenopausal women. *Br J Surg*. 2010; 97: 1013-1019

Sitges-Serra A, Girvent M, Pereira JA, Jimeno J, Nogues X, Cano FJ, Sancho JJ. Bone mineral density in menopausal women with primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *World J Surg*. 2004; 28(11): 1148-52

Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest*. 1996; 97(11): 2534-40

Smith D, Nance W, Won Kang K, Christian J, Johnston CJ. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 1973; 52: 2800-2808

Sosa M, Torres A, Martin N, Salido E, Limiñana JM, Barrios Y, de Miguel E, Betancor P. The distribution of two different vitamin D receptor polymorphisms (Bsm1 and start codón) in primary hyperparathyroidism. *J Intern Med* 2000; 247: 124-130

Spivacow FR, Martínez C, Polonsky A. Primary hyperparathyroidism: postoperative long-term evolution. *Medicina (B Aires)*. 2010; 70(5): 408-414

Sultan AH, Bruckner FE, Eastwood JB. Association between prolonged dietary vitamin D deficiency and autonomous hyperparathyroidism. *British Medical Journal*. 1989; 299: 236-237

Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol*. 2003; 17(5): 777-91

T Tai V, Leung W, Grey A, Reid IR, Bolland MJ. Calcium intake and bone mineral density systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015;351:h4183

Tamura Y, Araki A, Chiba Y, Mori S, Hosoi T, Horiuchi T. Remarkable increase in lumbar spine bone mineral density and amelioration in biochemical markers of bone turnover after parathyroidectomy in elderly patients with primary hyperparathyroidism: a 5-year follow-up study. *J Bone Miner Metab*. 2007; 25: 226-231

Tassone F, Gianotti L, Baffoni C, Visconti G, Pellegrino M, Cassibba S, Croce CG, Magro G, Cesario F, Attanasio R, Borretta G. Vitamin D status in primary hyperparathyroidism: a Southern European perspective. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(6):784-90

Tu P, Duan P, Zhang RS, Xu DB, Wang Y, Wu HP, Liu YH, Si L. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2015; 26(1): 179-85

Tuna MM, Çahskan M, Ünal M, Demirci T, Dogan BA, Küçükler K, Özbek M, Berker D, Delibasi T, Güler S. Normocalcemic hyperparathyroidism is associated with complications similar to those of hypercalcemic

hyperparathyroidism. *J Bone Miner Metab.* 2015 Jun 9. [Epub ahead of print]. DOI 10.1007/s00774-015-0673-3

V Van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, Colin EM, Fang Y, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(14): 1745-54

Vezzoli G, Scillitani A, Corbetta S, Terranegra A, Dogliotti E, Guarnieri V, Arcidiacono T, Macreina L, Mingione A, Brasacchio C, Eller-Vainicher C, Cusi D, Spada A, Cole D, Hendy G, Spotti D, Soldati L. Risk of nephrolithiasis in primary hyperparathyroidism is associated with two polymorphisms of the calcium-sensing receptor gene. *J Nephrol* 2015 Feb;28(1):67-72

Vilariño-Güell C, Miles LJ, Duncan EL, Ralston SH, Compston JE, Cooper C, Langdahl BL, Maclelland A, Pols HA, Reid DM, Uitterlinden AG, Steer CD, Tobias JH, Wass JA, Brown MA. PTHR1 polymorphisms influence BMD variation through effects on the growing skeleton. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81 (4): 270-278

W Wang CL, Tang XY, Chen WQ, Su YX, Zhang CX, Chen YM. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in chinese women: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007; 18(3): 295-305

Wermers RA, Khosla S, Atkinson EJ, Achenbach SJ, Oberg AL, Grant CS, Melton LJ. Incidence of primary hyperparathyroidism in Rochester, Minnesota 1993-2001: an update on the changing epidemiology of the disease. *J Bone Miner Res* 2006; 21:171-177

WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva, Switzerland. World Health Organization Technical Report Series 1994; 843: 1-129

Wood K, Dhital S, Chen H, Sippel RS. What is the utility of distal forearm DXA in primary hyperparathyroidism?. *Oncologist.* 2012; 17(3): 322-5

Y Yamashita H, Noguchi S, Uchino S, Watanabe S, Koike E, Murakami T, Fujihira T, Koga Y, Masatsugu T, Yamashita H. Vitamin D status in Japanese patients with hyperparathyroidism: seasonal changes and effect on clinical. *World Journal of Surgery.* 2002; 26: 937-41

Yeh MW, Ituarte PH, Zhou HC, y col. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: 1122-1129

Yoskovitz G, Garcia-Giralt N, Rodriguez-Sanz M, Urreizti R, Guerri R, Ariño-Ballester S, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky L, Grinberg D, Nogues X, Balcells S, Diez-Perez A. Analyses of RANK and RANKL in the post-GWAS context: functional evidence of vitamin D stimulation through a RANKL distal región. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(12): 2550-60

Z Zhang YY, Liu PY, Lu Y, Xiao P, Liu YJ, Long JR, Shen H, Zhao LJ, Elze L, Recker RR, Deng HW. Tests of linkage and association of PTH/PTHrP receptor type 1 gen with bone mineray density and height in caucasians. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(1): 36-41

Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitaminD3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitaminD3 and parathyroid hormone. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2003; 88: 234-237

ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Apreciada participante:

Le agradecemos su colaboración en el estudio de la influencia de los genes en la recuperación de masa ósea tras ser intervenida de un Hiperparatiroidismo Primario. Como ya le habrá informado su médico, esta enfermedad se asocia en muchos casos a la presencia de osteoporosis. En los últimos años se ha visto que la densidad del hueso puede mejorar tras la cirugía del hiperparatiroidismo, aunque no lo hace en todos los casos. Este estudio puede ayudar a conocer si existen mujeres con predisposición genética a tener una mejor respuesta al tratamiento quirúrgico de esta enfermedad.

Actualmente, la investigación médica sobre las enfermedades óseas avanza rápidamente y, por ello, sería importante que usted nos dé su consentimiento para guardar algunas muestras de su sangre para los estudios genéticos. Estas muestras se las extraeremos al mismo tiempo que el análisis que le ha pedido su médico. Estas muestras servirán para averiguar si existe una predisposición genética en la mejoría de la masa ósea que se observa, en algunos casos, tras la paratiroidectomía. El material genético no utilizado en el presente estudio, se almacenará para estudios posteriores, siempre relacionados con la osteoporosis. Este análisis para obtener material genético va a suponer solamente la extracción de 15 ml suplementarios de sangre. Le tendremos informada de cualquier hallazgo significativo para su salud.

Le garantizamos que sus datos serán tratados con absoluta confidencialidad de acuerdo con la Ley Orgánica de Confidencialidad de datos personales (Ley orgánica 5/1992), y el material genético solo será utilizado para investigar sobre osteoporosis. Nunca se utilizará para ningún otro propósito. Usted tiene derecho a solicitarnos en cualquier momento que eliminemos de los registros sus datos personales y a recibir los resultados de las exploraciones que le hagan.

Para llevar a cabo el proyecto que le hemos expuesto, las disposiciones legales vigentes (Ley del Medicamento 25/1990 y el Real Decreto 561/1993) aconsejan que le pidamos su autorización.

Antes de firmar este documento de autorización y en cualquier momento, usted puede pedir cualquier aclaración a los médicos responsables del estudio.

La Sra....., ha sido informada de las finalidades del presente estudio, ha podido hacer las preguntas que ha considerado oportunas y acepta participar voluntariamente en él. Así mismo, acepta que los investigadores del estudio obtengan el material biológico necesario (sangre total) para realizar los estudios genéticos.

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin dar explicaciones y ello no repercutirá en mi tratamiento.

En prueba de conformidad firma la presente:

En....., a..... de.....del 20....

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

**Quick
PROTOCOL**

Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution		Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution
	Cell	Nuclei			
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM050, Section 3.C.

Red Blood Cell Lysis

- Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
- Incubate for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge:

≤300µl sample	13,000–16,000 × g*	20 seconds
1–10ml sample	2,000 × g	10 minutes
- Discard supernatant. Vortex pellet.

Nuclei Lysis and Protein Precipitation

- Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
- Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
- Centrifuge:

≤300µl sample	13,000–16,000 × g*	3 minutes
1–10ml sample	2,000 × g	10 minutes

DNA Precipitation and Rehydration

- Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
- Centrifuge:

≤300µl sample	13,000–16,000 × g*	1 minute
1–10ml sample	2,000 × g	1 minute
- Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
- Centrifuge as in Step 9.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
- Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

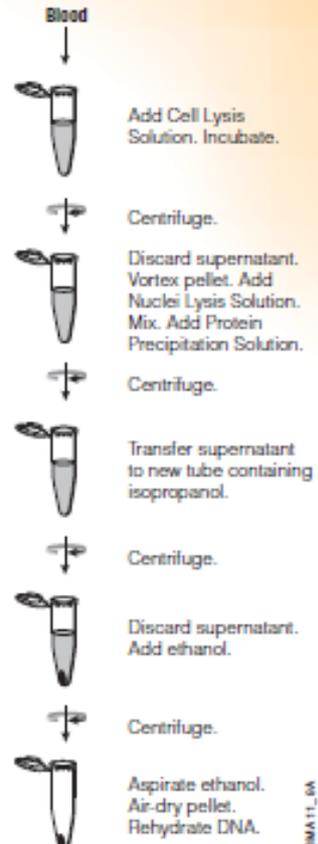
*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©1999–2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.



2810MA11_0A
P11000



Printed in USA. Revised 10/10
Part #9FB022

ANEXO 3:

ANEXO 3- Tabla 1A: Características demográficas, analíticas y densitométricas basales de las pacientes que han finalizado el estudio y de las pacientes de las que no se dispone de seguimiento al año de la PTx

	Pacientes que han completado el estudio n = 142	Pacientes de las que no se dispone de seguimiento al año n = 17	Prueba de Levene de calidad de varianzas
Edad (años)	65,6 ± 9,5	67,6 ± 12,1	NS
Peso (Kg)	67,6 ± 10,9	70,9 ± 8,5	NS
Talla (cm)	157 ± 6	155 ± 6	NS
Edad menopausia (años)	47,8 ± 6,1	47,1 ± 6,5	NS
Ca (mg/dL)	11 ± 0,9	11,5 ± 1	NS
P (mg/dL)	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,6	NS
25-OH VitD (ng/mL)	20,1 ± 13,4	16,9 ± 12,7	NS
1,25- OH ₂ VitD (pg/mL)	61,6 ± 24,7	44,8 ± 22,1	NS
PTH (pg/mL)	169,31 ± 147,27	236,7 ± 244,13	NS
Ca _o (mg/24h)	367,6 ± 132,38	230,7 ± 175,37	NS
P _o (mg/24h)	893,31 ± 379,43	685,2 ± 323,87	NS
DMO a nivel de CL	0,799 ± 0,147	0,866 ± 0,170	NS
DMO a nivel de CF	0,626 ± 0,101	0,626 ± 0,092	NS
DMO a nivel de CT	0,762 ± 0,120	0,714 ± 0,194	NS
DMO a nivel de 1/3 PT	0,544 ± 0,083	0,579 ± 0,104	NS
DMO a nivel UD	0,300 ± 0,062	0,351 ± 0,061	NS

Datos presentados como media ± desviación estándar
DMO presentada en g/cm²

ANEXO 3- Tabla 1B: Características demográficas, analíticas y densitométricas basales de las pacientes que han finalizado el estudio y de las pacientes de las que no se dispone de seguimiento a los dos años de la PTx

	Pacientes que han completado el estudio n = 142	Pacientes de las que no se dispone de seguimiento al año n = 67	Prueba de Levene de calidad de varianzas
Edad (años)	65,6 ± 9,5	67,09 ± 10,6	NS
Peso (Kg)	67,6 ± 10,9	69,5 ± 11,9	NS
Talla (cm)	157 ± 6	157 ± 8	NS
Edad menopausia (años)	47,8 ± 6,1	47,3 ± 5,8	NS
Ca (mg/dL)	11 ± 0,9	11,1 ± 0,9	NS
P (mg/dL)	2,9 ± 0,6	2,9 ± 0,5	NS
25-OH VitD (ng/mL)	20,1 ± 13,4	17,9 ± 13,6	NS
1,25- OH ₂ VitD (pg/mL)	61,6 ± 24,7	57,3 ± 24,9	NS
PTH (pg/mL)	169,31 ± 147,27	201 ± 186,47	NS
Ca _o (mg/24h)	367,6 ± 132,38	314 ± 192,7	NS
P _o (mg/24h)	893,31 ± 379,43	834,28 ± 355,43	NS
DMO a nivel de CL	0,799 ± 0,147	0,833 ± 0,170	NS
DMO a nivel de CF	0,626 ± 0,101	0,620 ± 0,091	NS
DMO a nivel de CT	0,762 ± 0,120	0,747 ± 0,153	NS
DMO a nivel de 1/3 PT	0,544 ± 0,083	0,555 ± 0,084	NS
DMO a nivel UD	0,300 ± 0,062	0,311 ± 0,068	NS

Datos presentados como media ± desviación estándar

DMO presentada en g/cm^2

ANEXO 3 – Tabla 2: Características demográficas, analíticas y densitométricas basales de las pacientes de las que se dispone de estudio genético respecto a la población perdida

	Pacientes con estudio genético n = 104	Pacientes sin estudio genético n = 55	Prueba de Levene de calidad de varianzas
Edad (años)	65,1 ± 9,4	67,3 ± 10,6	NS
Peso (Kg)	68,2 ± 10,6	67,6 ± 10,7	NS
Talla (cm)	157 ± 7	155 ± 5	NS
Edad menopausia (años)	48,3 ± 5,8	46,4 ± 6,5	NS
Ca (mg/dL)	11,1 ± 1	11,1 ± 0,9	NS
P (mg/dL)	2,9 ± 0,6	2,9 ± 0,6	NS
25-OH VitD (ng/mL)	20,7 ± 14,8	17,7 ± 9,5	NS
1,25-OH ₂ VitD (pg/mL)	58,2 ± 26,1	61,3 ± 23,1	NS
PTH (pg/mL)	173,7 ± 151,5	185,7 ± 184,470	NS
Ca _o (mg/24h)	347,7 ± 181,8	346,9 ± 196,9	NS
P _o (mg/24h)	889,43 ± 388,7	825,5 ± 360,64	NS
DMO a nivel de CL	0,821 ± 0,142	0,782 ± 0,163	NS
DMO a nivel de CF	0,625 ± 0,093	0,627 ± 0,114	NS
DMO a nivel de CT	0,764 ± 0,112	0,740 ± 0,164	NS
DMO a nivel de 1/3 PT	0,534 ± 0,086	0,604 ± 0,057	NS
DMO a nivel UD	0,303 ± 0,064	0,324 ± 0,062	NS

Datos presentados como media ± desviación estándar
DMO presentada en g/cm^2

ANEXO 4:

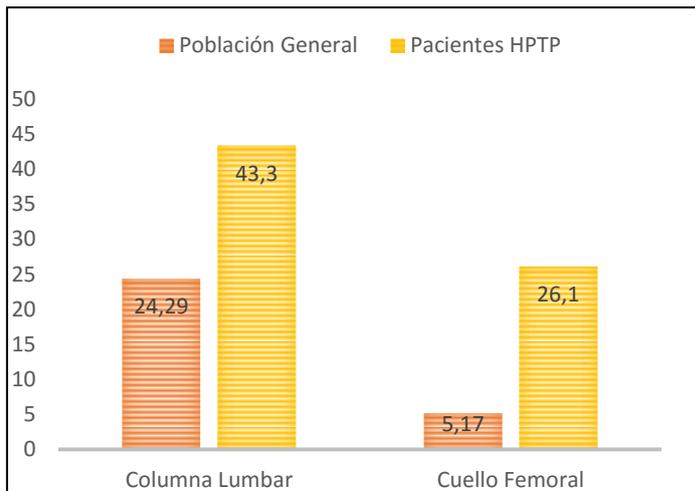


Figura 1: Prevalencia de osteoporosis en la población general y en las pacientes con HPTP

ANEXO 5- Tabla 1: Publicaciones revisadas que valoran la evolución de la DMO tras intervención quirúrgica

Primer autor	Año publicación	Pacientes	Variable estudio	Lugares de medición de DMO	Lugar de aumento significativo de DMO postPTx
Silverberg*	1999	61	Porcentaje de cambio	CL, CF, 1/3PR	CL (p<0,005), CF (p<0,002)
Nakaoka**	2000	44	Porcentaje de cambio	CL, 1/3PR	CL (p<0,0001), 1/3PR (p<0,01)
Rao*	2004	23	Porcentaje de cambio	CL,CF, CT, 1/3PR	CL (p<0,001), CF (p=0,031), 1/3PR (p<0,001)
Nordenström**	2004	126	Z-score, g/cm ²	CL, CT, CF	CL (p<0,001), CT (p<0,001), CF (p<0,001)
Sitges-Serra**	2004	52	T-score, Z-score, g/cm ²	CL ^e , CT, CF	CT (p<0,0001), CF (p=0,04)
Nomura**	2004	97	Porcentaje de cambio	CL, 1/3PR	CL (p<0,01), 1/3PR (p<0,01)
Almqvist*	2004	50	T-score, Z-score, g/cm ²	CL, CT	CL (p<0,01), CT ^d (p<0,05)
Hagström**	2006	49	Porcentaje de cambio	CL, CF	CL (p<0,002), CF ^b (p=0,013)
Ambrogini *	2007	24	Porcentaje de cambio	CL, CT, 1/3PR	CL (p=0,0002), CT (p=0,0001)
Bollerslev*	2007	60	g/cm ²	CL,CF, 1/3PR, UD	CL (p<0,01), CF ^a (p=0,048)
Tamura*	2007	11	Porcentaje de cambio	CL, CT, 1/3PR	CL (p<0,01)
Lumachi**	2007	48	g/cm ²	CL	CL ^c (p<0,01)
Rubin*	2008	59	Porcentaje de cambio	CL, CF, 1/3PR	CL (p<0,05), CF (p<0,05), 1/3PR (p<0,05)
Moosgaard*	2008	60	g/cm ²	CL, CF, 1/3PR	CL (p<0,001)
Sitges-Serra**	2010	103	T-score, g/cm ² , porcentaje de cambio	CL, CT, CF	CL (p<0,001), CT (p<0,001), CF (p=0,001)
Spivacow**	2010	87	Porcentaje de cambio y g/cm ²	CL, CF	CL (p<0,001), CF (p<0,01)
Kersch-Schindl**	2012	52	g/cm ²	CL, CF	CL (p=0,008)
Hansen **	2012	27	g/cm ²	CL, CT, US, 1/3 PR	CL (p<0,01), CT (p<0,01)
Keutgen*****	2012	17	T-score	CL, CT	CL (p= 0,017)
Alonso**	2012	53	g/cm ² , T-score, Z-score	CL	CL (p<0,05)
Koumakis****	2013	60	Porcentaje de cambio	CL, CT	CL ^g (p=0,0003), CT ^g (p=0,003)
Rolighed**	2013	236	Porcentaje de cambio	CL, CT, 1/3 PR	CL (IC 95%: 2,1 a 3,1), CT (IC 95%: 1,5 a 1,9)
Norenstedt***	2014	150	Porcentaje de cambio	CL, CT, CF, 1/3 PR	CL (p<0,001), CT (p<0,001), CF (p<0,001), 1/3 PR ^f (p<0,013)
Quiriny **	2014	24	T-score, Z-score	CL, CT	CL ^h (p=0,008), CT ^h (p=0,034)

*Estudios randomizados que valoran la evolución de la DMO en pacientes paratiroidectomizados vs pacientes no intervenidos

** Estudios observacionales

***Estudio randomizado que valora el cambio de DMO tras PTx en función de suplementación con Calcio y Vitamina D

****Estudio randomizado que valora el cambio de DMO tras PTx en función de presentación clínica: normocalcemia vs hipercalcemia

*****Estudio randomizado que valora cambio de DMO en pacientes paratiroidectomizados vs tratamiento médico (calcimiméticos)

^a Si solo se analizan las mujeres intervenidas. Si se analizan mujeres + hombres no hay aumento significativo de la DMO

^b Si solo se analizan las mujeres menores de 67 años. Si se incluyen todos los pacientes no hay aumento significativo de la DMO

^c Si solo se analizan las mujeres premenopáusicas. Si se analizan todas las pacientes no hay aumento significativo de la DMO

^d Si solo se analizan los pacientes intervenidos en el momento del diagnóstico. Si se analizan los pacientes intervenidos al año del diagnóstico no se evidencia un aumento significativo de la DMO

^e Si se analiza la DMO mediante el valor absoluto g/cm² no se evidencia aumento significativo de la DMO. Si se analiza la DMO mediante la T-score y la Z-score si se produce un aumento significativo de la DMO (p= 0.04 y p=0.007 respectivamente)

^f Si solo se analizan los pacientes suplementados con Calcio y Vitamina D

^g Si se analizan las pacientes con HPTP normocalcémico: CL (p<0,016), CT (p<0,048)

^h Solo si se analiza mediante la T-score

AGRADECIMIENTOS

Hace ya unos cuantos años que este proyecto se puso en marcha. Han sido muchos los alti-bajos durante el camino y muchas las personas que me han ayudado a que el presente trabajo llegara a su fin. Han sido y son, un gran número de personas, muy diferentes entre ellas y de ámbitos muy dispares, las que han contribuido, de un modo u otro, a que finalmente este año pueda presentar esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradecer al Dr. Nogués haber aceptado ser el director de la misma. Dar las gracias por su tiempo y sus consejos durante el proceso, ha sido largo pero finalmente he conseguido uno de los objetivos que tiene una Tesis Doctoral. He aprendido no sólo como plantear, desarrollar y llevar a término un trabajo de investigación, sino también como no debe hacerse. De los errores también se aprende, y mucho. Gracias de nuevo por el tiempo y la paciencia.

También he de agradecer al Dr. Díez el haber formado parte del proyecto como tutor. Con su peculiar sentido del humor ha conseguido hacer hincapié en elementos clave y proporcionar nuevas visiones de los resultados obtenidos.

Dar las gracias al Dr. Sitges-Serra y al Dr. Sancho, ambos cirujanos de la Unidad de Cirugía Endocrina del Hospital del Mar. Gracias por ayudarme en la inclusión de pacientes y en su seguimiento post-paratiroidectomía.

Tampoco puedo ni debo olvidarme de Chus, Pilar e Isabel. Gracias por ese “plus” de trabajo que ha significado la obtención de muestras para genética y la realización de densitometrías de antebrazo.

Especial mención requiere Natalia. Gracias por acompañarme en el descubrimiento del apasionante mundo de la genética. Gracias por el tiempo y la paciencia utilizada para hacerme de guía.

Y finalmente agradecer a Dani su ayuda en los análisis estadísticos más complejos.

Pero no solo debo dar las gracias a las personas que me han ayudado directamente en la realización de este estudio. También debo dar las gracias a aquellas personas que me han permitido tener el tiempo suficiente como para utilizarlo en este menester.

En primer lugar a Polola, como jefa me ha permitido adaptar los horarios de trabajo como para poder compaginar la tesis doctoral con el trabajo asistencial del día a día. Y en segundo lugar a las “Mòniques”, no sólo por ser unas excelentes compañeras de trabajo sino por ser unas amigas excepcionales. Gracias por mostrarme cada día el valor de las pequeñas cosas. Hacéis que sea mejor médico y mejor persona!

Es muy difícil poder concluir un proyecto de este tipo si no se tiene una vida plena y tranquila. Ello depende de muchos factores, pero la familia y los amigos son un elemento esencial en ese equilibrio.

Amigos son, afortunadamente, muchos. Amigos de infancia, amigos de juventud, amigos de universidad, amigos de residencia... Gracias Raquel, gracias Mònica y Gisella, gracias Toni y Jason, gracias Mònica (sabes que tu fuerza y valentía son un ejemplo), gracias Skamot (Silvies, Irina, Rita, Cris, Nuria, Olga, Txell), gracias a los “papis” de la guarde y el cole, y gracias a la cuadrilla del café!

Y como no, dar gracias a mis padres. Su esfuerzo y dedicación me permitieron cumplir un sueño: ser médico. Siempre estaré en deuda con vosotros por el trabajo y sacrificio que ello ha significado.

He dejado adrede para el final, a las dos personas más importantes de mi vida. Pako, Joan, gracias por dar sentido a lo que hago y gracias por hacerme feliz. Os quiero.

