



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

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

Año 2021

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA Y
MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**

Autora

Arántzazu Conesa Mateos

Directora de Tesis

Dra. Natalia García Giralt

Tutor de Tesis

Dr. Francesc Xavier Nogués Solán

**Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto
y pensar lo que nadie ha pensado**

Albert Szent-György

A mi familia, y en especial a Dani y a Diego.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de tesis, ha sido un largo viaje de vivencias y de aprendizaje donde he podido conocer, compartir, escuchar y aprender de los muchos sabios y maestros, compañeros, amigos que me han acompañado en esta aventura. En estos momentos cuando estoy poniendo el punto final, son muchos los sentimientos, emociones y recuerdos que me inundan, muchas lágrimas de felicidad y de añoranza, de todos los momentos vividos con todos vosotros que habéis hecho posible que este proyecto tomara forma y llegara a su fin.

No puedo empezar sin agradecer de todo corazón, a ti Dr. Rotés, mi amigo Delfí, por compartir conmigo toda tu sabiduría, conocimientos y por transmitirme tu experiencia, tu ciencia y tu ilusión por esta maravillosa enfermedad. Y enseñarme que el esfuerzo tiene recompensa como esta. Siempre recordaré tus clases magistrales en el Hospital de la Esperanza y los congresos de Oxford, donde compartimos experiencia con todos los “GRANDES” como tú. No nos pudimos despedir, pero siempre has estado ahí y estarás, eres parte importante de la historia de esta enfermedad y por ende de este proyecto y de nuestras vidas.

Como todos los proyectos importantes, aquellos que forman parte de ti y te acompañan allí donde vas, así has sido tú, inseparable, un fiel amigo. Gracias a ti, he podido conocer, aprender y compartir experiencias y habilidades en el ámbito de la ciencia básica y clínica, sobretodo descubrir grandes amigos, compañeros, todos ellos muy sabios.

Esta andadura se inició en el Hospital del Mar y de la Esperanza, actualmente Parc de Salut Mar, maravilloso hospital y mejor gente, donde aprendí de todos vosotros mis adjuntos, mis maestros, mis compañeros (Jordi Carbonell, Pere Benito, Jordi Monfort, Joan Maymó, Anna, Blanch, Ciria, Luis, Campillo, mi Delfí) y mis “R” mayores (Carlos, Nuria, Mónica, Carol, Mapi, Miriam, Xavi, Vicenç, Emma) y mis pequeños (Joan, Eli, Delia, Juan, Sonia), mis enfermeras (Isabel, Silvia), auxiliares y mi Nuria. Una gran familia donde me hicisteis sentir como en casa, muchas gracias por todos esos momentos de sabiduría, experiencias, aprendizaje, risas, nervios, sesiones, abrazos..... Una época inolvidable e imborrable. “Muchas gracias a todos”.

Agradecimientos

Y entonces apareció la ciencia básica, las poyatas, los ELISAs, el Western Blot, los SNPs, el HapMap, el IMIM, y os conocí, Natalia y Susana, fantásticas, mis biólogas favoritas. ¡Cuánto he aprendido de vosotras!. Me abristeis un mundo infinito de posibilidades, y me enamoré para siempre de los genes. Mi paso por el Instituto de Investigación del Hospital Vall d'Hebron con la Dra Sara Marsal, a quien tengo que agradecer por compartir conmigo su conocimiento y sabiduría, confirmó mi buena relación con la ciencia básica.

Desde ese momento, Natalia, mi directora y amiga, me has acompañado durante más de una década en este proyecto. Mil gracias por compartir conmigo tu tiempo, tu sabiduría, tu infinita capacidad de síntesis, que tanto agradezco y sobretodo hacer fácil lo difícil. Y a ti Xavi Nogués, por estar ahí en los momentos difíciles. Gracias de todo corazón a los dos, sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Años más tarde, mi destino y mis ganas de aprender hicieron que llegara al Hospital Clínic de Barcelona, donde os conocí a todas, a mis maestras y a mis sabias del metabolismo óseo, a la Dra Nuria Guañabens, Anna Monegal, Pilar, Dacia, y a mis niñas Àngels, Laia, Raquel, Silvia, Anna, os agradezco todos esos momentos de sabiduría, ciencia, risas, *coffes*, abrazos..."Mil gracias a todas por acogerme como una más".

Durante estos años, hemos recorrido un largo camino juntos, y siempre hemos estado acompañados de personas maravillosas, generosas que han hecho posible lo imposible, gracias a mis chicas Blanca, Anna, Cris, Piera, Àngels, Noelia por vuestros ánimos, y porque no habéis perdido la esperanza en mi, a pesar de mis dudas sobre el fin de este proyecto. "Mil gracias chicas".

Y al final, la vuelta a casa, donde el destino ha querido que coincidiéramos en el camino, donde la verdad, estoy en CASA, a vuestro lado. Gracias Miguel Ángel, mi "Superjefe", mi compañero, mi amigo, donde cada día me llevo un aprendizaje nuevo, de la vida, de la ciencia, de la superación, eres un ejemplo a seguir. Y a ti Toni, gracias por estar ahí, por hacer lo difícil fácil y por tu entrega, por tu disposición. Mil gracias a los dos, por acogerme en vuestra vida.

Todo esto no hubiera sido posible sin vosotros, GRACIAS por vuestra generosidad, altruismo y solidaridad de todos vosotros, mis queridísimo pacientes, que no dudásteis en colaborar con este proyecto sin importaros que una médico residente entrará en vuestras vidas. "Muchísimas gracias a todos"

Agradecimientos

Y por último, no podría haber llevado a cabo este proyecto sin vosotros, MI FAMILIA, gracias por estar ahí, por vuestro apoyo inconmensurable, vuestra paciencia infinita, por vuestra disposición sin medida y por vuestro ánimo sin descanso. Gracias a vosotros, PAPÁ y MAMÁ, por el apoyo incondicional, por estar ahí SIEMPRE y por enseñarme que el esfuerzo y el trabajo bien hecho tienen recompensa. A mis chicos, mis AMORES, a ti Diego GRACIAS MIL, por estar ahí cada día, por el apoyo incondicional e infinito, por los abrazos, por “el tú puedes”, por acompañarme en la vida, y por darme mi mejor PROYECTO DE VIDA, mi pequeño, mi Dani, mi VIDA, gracias por tu comprensión infinita y por tus abrazos y tu amor y por “MAMI, LO CONSEGUIRÁS”.

GRACIAS a todos por estar ahí, porque este proyecto es un pedacito de todos vosotros y sin vosotros no hubiera sido POSIBLE.

Agradecimientos

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína activadora-1
APAF-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica
aPKC	Proteína quinasa atípica C
AZ	Ácido zoledrónico
Bcl-2	Célula B del linfoma 2
BFs	Bifosfonatos
Bid	Proteína proapoptótica perteneciente a la familia de Bcl-2
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
CAII	Anhidrasa carbónica II
CAT K	Catepsina K
CFU-GM	Unidades formadoras de colonias gránulo monocíticas
CFU-S	Unidades formadoras de colonias esplénicas
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
CSF-M	Factor estimulante de colonias de macrófagos
CTR	Receptores de calcitonina
CTx	Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de la célula dendrítica
ddNTP	Didesoxinucleótido
DFT	Demencia frontotemporal
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
Dkk-1	Dickkopf-1
DR	Receptores específicos
Ds	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EOP	Enfermedad Ósea de Paget
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESH	Hiperfosfatasa esquelética expansiva
FA	Fosfatasa alcalina
FA ósea	Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FEO	Osteólisis expansiva familiar
FPP	Farsenil pirofosfato sintetasa
Gh	Hormona de crecimiento
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IGF-I y II	Factor de crecimiento insulínico tipo I y II

IL	Interleucina
JPD	Enfermedad de Paget juvenil
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH parecida a Kelch
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma 2A
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por TOF
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MMP-9	Metaloproteinasas de matriz -9
MRO	Marcadores de remodelado óseo
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
NTx	Telopéptido aminoterminal del colágeno tipo I
OPG	Osteoprotegerina
OPTN	Optineurina
OR	Odds ratio
OSCAR	Receptor asociado a osteoclastos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDG-F	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PINP	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I
PML	Leucemia promielocítica
PTH	Hormona paratiroidea
RANK	Receptor del activador del factor nuclear kappa β
RANKL	Ligando del receptor del activador del factor nuclear kappa β
RIP1	Proteína 1 que interactúa con el receptor
RUNX2	Factor de transcripción relacionado con Runt
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
SQSTM1	Sequestosoma 1
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFRSF	Superfamilia del receptor del TNF
TNFRSF11	Miembro 11 de la superfamilia del ligando del TNF
TNFRSF11A	Miembro 11A de la superfamilia de receptor del TNF
TNFRSF11B	Miembro 11B de la superfamilia del receptor del TNF
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
UPS	Sistema ubiquitina-proteosoma
URO	Unidades de remodelado óseo
VCP	Proteína que contiene valosina

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Imágenes radiológicas de la EOP según su localización. [Adaptada de Cundy T, 2008]^{42,58}
- Tabla 2.** Bifosfonatos aprobados en España para la EOP.
- Tabla 3.** Enfermedades hereditarias del metabolismo óseo causadas por mutaciones en los genes *RANKL*, *RANK* y *OPG*.
- Tabla 4.** Fenotipos de los síndromes hereditarios asociados con las diferentes mutaciones de inserción en el exón 1 del gen *TNFRSF11A*. [Adaptado de Ralston SH, 2019]²⁸¹.
- Tabla 5.** Población de riesgo de Barcelona durante el período de estudio (3 distritos del área metropolitana de Barcelona, perteneciente al área del Hospital del Mar- Parc de Saut Mar).
- Tabla 6.** Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según los grupos de edad.
- Tabla 7.** Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según el género.
- Tabla 8.** Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según los grupos de edad y el género.
- Tabla 9.** Los polimorfismos seleccionados de los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*). Identificación de SNPs, localización, eficiencia del genotipado, frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor).
- Tabla 10.** Número (%) de nuevos diagnósticos de EOP, estratificados según los grupos de edad y los periodos de estudio.
- Tabla 11.** La incidencia de nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo. Se expresa con la media (IC 95%) por 100.000 personas-año. Estratificados según los grupos de edad y los periodos de estudio.
- Tabla 12.** La incidencia por 100.000 personas-año de nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo, según el género. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudio.
- Tabla 13.** Características clínico-demográficas de los pacientes en el momento del diagnóstico, así como el tratamiento realizado y las complicaciones presentes durante el curso de la enfermedad y la influencia del género.
- Tabla 14.** Características clínicas de los pacientes en el momento del diagnóstico, así como el tratamiento administrado y las complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad, en función de la captación gammagrafía (Monostótico/Polioistótico).
- Tabla 15.** Porcentaje de distribución anatómica de las localizaciones afectas de EOP por gammagrafía ósea, en función del género.
- Tabla 16.** Porcentaje de distribución anatómica de de las lesiones óseas afectas de EOP por gammagrafía ósea, en función del patrón gammagráfico (monostótico/polioistótico).

Tabla 17. Cambios seculares de los índices de severidad (marcadores de actividad y extensión) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento.

Tabla 18. Cambios seculares de los índices de severidad (marcadores de actividad y extensión) durante el periodo de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

Tabla 19. Tendencia secular en el método diagnóstico utilizado en nuestra población de EOP en función del año del diagnóstico.

Tabla 20. Asociación entre las complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad y los índices de severidad.

Tabla 21. Predictores independientes basales de la presencia de complicaciones durante el curso de la enfermedad.

Tabla 22. Características clínico-demográficas de la población de estudio afecta de EOP.

Tabla 23. Características clínico-demográficas de la población afecta EOP, en función del género.

Tabla 24. Características clínico-demográficas de la población afecta de EOP en función de la presencia de una historia familiar positiva.

Tabla 25. Descripción de los polimorfismos genotipados en el gen *TNFRSF11A* y análisis del riesgo en función del modelo de herencia. Identificación de SNPs, localización, eficiencia del genotipado, Frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor), Odds Ratio (IC 95%), p-valor (modelo herencia genéticos).

Tabla 26. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs1805034.

Tabla 27. Distribución genotípica y alélica en los diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos y controles) en el estudio del polimorfismo RANKrs1805034.

Tabla 28. Distribución genotípica del polimorfismo RANKrs1805034 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

Tabla 29. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs3018362.

Tabla 30. Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs3018362.

Tabla 31. Distribución genotípica del polimorfismo RANKrs3018362 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

Tabla 32. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs6567274.

Tabla 33. Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs6567274.

- Tabla 34.** Distribución genotípica del polimorfismo RANK rs6567274 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.
- Tabla 35.** Descripción de los polimorfismos genotipados en el gen *TNFRSF11B* y análisis del riesgo en función del modelo de herencia. Identificación de SNPs, localización, Eficiencia del genotipado, Frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor), Odds Ratio (IC 95%), p-valor (modelo de herencia).
- Tabla 36.** Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo OPGrs11573871.
- Tabla 37.** Distribución genotípica (GG/AG) del polimorfismo OPG rs11573871 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.
- Tabla 38.** Distribución alélica entre pacientes y controles del estudio de interacciones de los polimorfismos RANK rs1805034 y OPG rs11573871.
- Tabla 39.** Interacciones entre los polimorfismos estadísticamente significativos en función de los diferentes modelos genéticos codominante y dominante.
- Tabla 40:** Combinaciones con mayor significación en el análisis MDR (multifactor dimensionality reduction, www.epistasis.org).
- Tabla 41.** Características clínico-demográficas de la población afecta EOP, diferencias en cuanto al ser portador de mutaciones en el gen *SQSMT1*.
- Tabla 42.** Características clínico-demográficas de la población afecta EOP, diferencias en cuanto a la presencia de la mutación *SQSMT1 Pro392Leu*.
- Tabla 43.** Características de las diferentes mutaciones identificadas en las regiones codificantes del gen *SQSMT1* en nuestra población de pacientes.
- Tabla 44.** Características clínicas de los 54 pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSMT1*.
- Tabla 45.** Características clínico-demográficas de los pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSMT1* en función de la presencia de mutaciones “*missense*” y mutaciones “*nonsense*”.
- Tabla 46.** Características clínicas de los pacientes afectados de EOP portadores de la mutación p.K238E (p.Lys238Glu) respecto a la población de pacientes *SQSMT1* negativo
- Tabla 47.** Características clínicas de los pacientes afectados de EOP portadores de la mutación p.E274D (Glu274Asp) respecto a la población de pacientes *SQSMT1* negativo.

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del primer paciente diagnosticado de “Osteitis deformans”. Fotografía realizada en 1876, seis meses previos al fallecimiento del paciente. [Adaptada de Paget J, 1877]³.

Figura 2. Prevalencia de la EOP en las diferentes áreas geográficas.

Figura 3. Imágenes radiológicas de la EOP según su localización y la fase evolutiva (lítica, mixta, esclerosa) del hueso afecto. Imágenes procedentes de los pacientes afectados de EOP de nuestra serie.

Figura 4. Gamagrafía ósea con Tc99m (^{99m}Tc) /SPECT óseo, en la enfermedad ósea de Paget. Imágenes procedentes de los pacientes afectados de EOP de nuestra serie⁵⁶.

Figura 5. Ácido zoledrónico y la vía del mevalonato.

Figura 6. Unidad básica de remodelado óseo. [Adaptado de Bellido, 2014]⁹¹.

Figura 7. Etapas del remodelado óseo. Factores implicados en la comunicación entre células en las fases del remodelado óseo. [Adaptado de Negishi-Koga et al, 2012]⁸⁷.

Figura 8. Homeostasis ósea. Factores que influyen en la formación y resorción ósea. [Adaptado de Harada and Rodan, 2003]³²⁴.

Figura 9.A. Reguladores de la diferenciación del osteoclasto a partir de precursores hematopoyéticos. [Adaptado de Boyle et al., 2003]⁸¹. **B** El osteoclasto activo en la resorción. Resorción osteoclástica. Imagen de microscopia electrónica [Adaptado de: http://www.brsoc.org.uk/gallery/arnett_osteoclast.jpg, reproducida con el permiso de © Tim Arnett, The Bone Research Society]. **C.** Representación esquemática de un osteoclasto activo polarizado [Adaptado de Baron R., 2003]¹⁰⁹.

Figura 10. Sistema RANKL/RANK/OPG en la regulación de la osteoclastogénesis inducida por los osteoblastos, a través de la síntesis de OPG, que tras unirse a RANKL, impide la unión de éste al receptor de la membrana de los osteoclastos RANK, e inhibe la diferenciación osteoclástica. [Adaptado de Ferrari-Lacraz et al, 2009]⁹⁷.

Figura 11. Características del osteoclasto con fenotipo “Pagético” [Adaptado de Deborah L. et al. 2014]¹¹².

Figura 12. Estructura genética del gen SQSTM1. La equivalencia entre los exones del SQSTM1 y los dominios de la proteína p62 se indica mediante líneas discontinuas. [Adaptado de Sánchez-Martín P. & Komatsu M., 2018]¹⁸⁶.

Figura 13. Dominios estructurales de la proteína adaptadora multifuncional p62/SQSTM1. [Adaptado de Katsuragi Y, 2015]²³⁵.

Figura 14. Regulación positiva y negativa de la vía señalización RANK-TRAF6-SQSTM1-NF-κB en la osteoclastogénesis. [Adaptado de Rea, S, 2013]¹⁸⁷.

Figura 15. Degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). [Adaptado de Zapata, C, 2015]³²⁶.

Figura 16. La proteína p62 en la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados mediante el proceso de autofagia. [Adaptado de Donohue, E y col, 2014]²¹².

Figura 17. Estructuras de Nrf2 y Keap1. [Adaptada de Hayes, D.J, 2019]²³⁹.

Figura 18. Vías canónicas y no canónicas Keap1-Nrf2. [Adaptado de Yoshinori Katsuragi, 2016]²³⁵.

Figura 19. Eje RANK-TRAF6-p62-NF-Kb. [Adaptado de Ralston SH, Layfield R, 2012]².

Figura 20. Mutaciones localizadas en los diferentes dominios del gen *SQSMT1* en pacientes afectados de EOP clásica. [Adaptado de Rea S. et al., 2013]¹⁸⁷.

Figura 21. Osteopatías hereditarias y el sistema de señalización RANK/RANKL/OPG/NF-κB. [Adaptado de Whyte MP et al, 2002]²⁹⁵.

Figura 22. Fisiopatología de los síndromes hereditarios asociados a las mutaciones de inserción en el exón 1 del gen *TNFRSF11A*. [Adaptado de Ralston SH, 2019]²⁸¹.

Figura 23. Área de referencia poblacional (*Censo de población y vivienda 2010 Instituto Nacional de Estadística. Instituto de Estadística de Cataluña*)²³⁷.

Figura 24. Descripción de los procedimientos en el genotipado de alto rendimiento mediante la tecnología de MassARRAY® iPLEX Gold.

Figura 25. Estudio de la conservación aminoacídica interespecies para el polimorfismo RANK rs1805034 p.V192A.

Figura 26. Estudio de epistasis entre todos los pares de variantes a estudio en modelo codominante y dominante.

Figura 27. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.R161W.

Figura 28. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.H163Y.

Figura 29. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.K238E.

Figura 30. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.G262R.

Figura 31. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.E274D.

Figura 32. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.R321C.

Figura 33. Estudio de la conservación aminoacídica interespecie para la mutación p.G405S.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cambios seculares en la incidencia por 100.000 personas-año de los nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudio.

Gráfico 2. Cambio seculares en la incidencia por 100.000 personas-año de los nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo, según el género. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudios.

Gráfico 3. Porcentaje de la distribución anatómica de las lesiones óseas de la población afecta de EOP y la influencia del género.

Gráfico 4. Porcentaje de la distribución anatómica de las lesiones óseas de la población afecta de EOP por gammagrafía, en función del patrón gammagráfico (Monostótico/Poliostótico).

Gráfico 5. Cambios seculares de la distribución anatómica de las lesiones óseas, en porcentajes, respecto al año del diagnostico, años de nacimiento y edad del diagnóstico.

Gráfico 6. Cambios seculares de la distribución anatómica de las lesiones óseas, en porcentajes, respecto al año del diagnóstico, en función del género y de la captación gammagráfica.

Gráfico 7. Cambios seculares de los índices de extensión (número de localizaciones, distribución gammagráfica, índice de Coutris, índice anatómico de Renier) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento.

Gráfico 8. Cambios seculares de los índices de actividad (índice anatómico de Renier y múltiplos de FA) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento.

Gráfico 9. Cambios seculares de los índices de extensión (número de localizaciones, distribución gammagráfica, índice de Coutris, índice anatómico de Renier) durante el período de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

Gráfico 10. Cambios seculares de los índices de actividad (índice anatómico de Renier y múltiplos de FA) durante el período de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

Gráfico 11. Cambios seculares de la edad en el momento del diagnóstico en función del año del diagnóstico y año del nacimiento.

Gráfico 12. Caracterización de la tendencia secular en función del método diagnóstico utilizado en nuestra población de EOP en función del año del diagnóstico.

ÍNDICE



ÍNDICE

RESUMEN.....	39
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUCCIÓN.....	51
1.1. ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	51
1.1.1. Concepto y aproximación histórica	51
1.1.2. Epidemiología	53
1.1.2.1. Distribución geográfica	53
1.1.2.2. Cambios seculares	57
1.1.3. Clínica	59
1.1.3.1. Manifestaciones clínicas y complicaciones.	59
1.1.3.2. Cambios seculares en la clínica al diagnóstico	61
1.1.4. Diagnóstico	62
1.1.5. Tratamiento farmacológico y quirúrgico	67
1.1.5.1. Tratamiento farmacológico	67
1.1.5.2. Tratamiento quirúrgico.	72
1.1.6. Patogenia	73
1.1.6.1. Remodelado óseo.	73
1.1.6.2. Fases del remodelado óseo	74
1.1.6.3. Regulación del remodelado óseo	77
1.1.6.4. Fisiopatología de los Osteoclastos	79
1.1.6.4.1. Vías de señalización celular	81
1.1.6.5. Patogenia en la Enfermedad ósea de Paget	83
1.1.7. Etiología	86
1.1.7.1. Factores ambientales	87
1.1.7.2. Susceptibilidad genética. Heterogeneidad genética	88
1.2. GEN DEL SEQUESTOSOMA1. ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	91
1.2.1. Gen <i>SQSMT1</i> y proteína P62	91
1.2.2. Funciones de la proteína P62	94
1.2.2.1. Supervivencia celular mediada por la vía de de señalización RANK- TRAF6-NF-kB	94
1.2.2.2. Degradación de proteínas a través del sistema UPS	96
1.2.2.3. Autofagia	98
1.2.2.4. Apoptosis	101
1.2.2.5. Regulación del estrés oxidativo inducido por la ruta Keap1/Nrf2	103
1.2.3. Proteína p62/SQSMT1 en la enfermedad ósea de Paget	108

1.3. SISTEMA RANKL/RANK/OPG Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET	113
1.3.1. Gen <i>TNFRSF11B</i> y proteína OPG en la enfermedad ósea de Paget	115
1.3.2. Gen <i>TNFRSF11</i> y proteína RANKL en la enfermedad ósea de Paget	119
1.3.3. Gen <i>TNFRSF11A</i> y proteína RANK en la enfermedad ósea de Paget	119
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	128
3. OBJETIVOS.....	135
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	139
5. RESULTADOS.....	162
5.1. Estudio clínico y epidemiológico de la enfermedad ósea de Paget	162
5.2. Estudio de alteraciones moleculares en el gen <i>SQSTM1</i> (p62) e identificación de variantes polimórficas en los genes <i>TNFRSF11B</i> y <i>TNFRSF11A</i> en pacientes con enfermedad ósea de Paget.	187
5.2.1. Estudio de asociación de polimorfismos en los genes <i>TNFRSF11A</i> y <i>TNFRSF11B</i> en pacientes con enfermedad ósea de Paget	190
5.2.2. Estudio molecular del gen <i>SQSTM1</i> (p62) en pacientes con enfermedad ósea de Paget. Correlación genotipo-fenotipo	209
6. DISCUSIÓN.....	234
7. CONCLUSIONES.....	273
8. LÍNEAS DE FUTURO.....	277
9. BIBLIOGRAFÍA.....	283

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad ósea de Paget (EOP) se caracteriza por ser un trastorno crónico y focal del remodelado óseo que conlleva a variaciones del tamaño, densidad y consistencia de los huesos afectos así como una resistencia disminuida, favoreciendo la aparición de complicaciones como deformidades óseas, sordera, artropatía por vecindad y fracturas, causando deterioro de la capacidad funcional y de la calidad de vida. La EOP presenta una gran variabilidad en su distribución en función de la edad, género, etnia y área geográfica, a pesar que ha sido descrita en casi todos los continentes, se ha observado que su prevalencia y su distribución geográfica es heterogénea, con grandes diferencias entre regiones vecinas. Recientes estudios realizados en determinadas áreas geográficas parecen denotar cambios seculares en cuanto a la prevalencia, incidencia y gravedad al diagnóstico de la EOP, mostrando una disminución en las últimas décadas. En la actualidad, no disponemos de estudios realizados en regiones de baja prevalencia que aporten información sobre estas tendencias y la influencia del género en dichos cambios. La EOP se considera actualmente una enfermedad compleja, multifactorial con participación de forma sinérgica de factores ambientales y genéticos. El gen que ha mostrado mayor susceptibilidad es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*), las mutaciones descritas en él no explicarían de forma completa la patogenia de la EOP, dado que estas mutaciones no se encuentran en la mayor parte de los pacientes. Además, las mutaciones del gen *SQSTM1* muestran una penetrancia incompleta, enfatizando el papel de factores ambientales y de otros genes modificadores, en la etiología de la enfermedad. Los candidatos más claros son aquellos que, al igual que el gen *SQSTM1*, se encuentran relacionados con la osteoclastogénesis. El sistema RANKL/RANK/OPG constituye una vía de señalización clave en la determinación del balance del remodelado óseo, siendo un sistema de comunicación intercelular que regula especialmente la osteoclastogénesis. En la actualidad, son escasos los estudios acerca de variaciones genéticas en los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*) asociados a EOP clásica así como la existencia de interacciones genéticas entre ambos genes y el gen *SQSTM1*, que conduzca a un incremento de riesgo de EOP e incluso que influya en el fenotipo. Por consiguiente, y con la finalidad de investigar el patrón de comportamiento clínico-

epidemiológico como genético de la EOP de nuestra población de baja prevalencia, nos planteamos los siguientes objetivos.

Los *objetivos* se centraron en evaluar cambios en la evolución del porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP durante el período del estudio (1970-2009) y describir en dichos pacientes diferencias en cuanto a la severidad en el momento del diagnóstico. Y determinar la existencia de factores independientes predictivos de severidad en el momento del diagnóstico. Así como así como analizar la importancia de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (*p62*) y la presencia de variaciones alélicas en los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*), tanto en la susceptibilidad para el desarrollo de la EOP como la influencia en su fenotipo.

Pacientes y Métodos: Estudio descriptivo ambispectivo observacional de pacientes procedentes del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar (Barcelona), un área de baja prevalencia. Se incluyeron un total de 393 pacientes, diagnosticados y/o en seguimiento durante el período comprendido entre enero de 1970 a diciembre de 2009. En base al estudio molecular se llevó a cabo el genotipado de las 21 variantes polimórfica mediante tecnología MassARRAY®iPLEX Gold para el estudio los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*), así como se realizó la secuenciación del gen *SQSTM1* (*p62*) en una población de 200 pacientes afectos de EOP y 200 controles hipernormales. El análisis estadístico se realizó mediante paquete SPSS para Windows (v23) y el software R versión 2.15.0 para Windows.

Resultados: En el estudio destaca un descenso progresivo del porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP en relación a la población de referencia, entre 1994 y 2009, más marcado en el grupo de \geq de 65 años. Asimismo, se ha constatado que los pacientes afectos de EOP presentan una disminución en la actividad biológica de la enfermedad, una menor extensión de la enfermedad y una mayor edad de presentación en el momento del diagnóstico, en función del año de nacimiento y año del diagnóstico. En contraposición, se ha observado mayor severidad en el momento del diagnóstico en los pacientes con edades al diagnóstico de <45 años y ≥ 75 años. Se han identificado 5 factores independientes de mal pronóstico al diagnóstico, que van a favorecer peores desenlaces, como la presencia de complicaciones durante el curso de la enfermedad. Por lo que podemos concluir, que en el momento de diagnóstico de EOP, la expresión de la enfermedad es menos severa y acontece de forma más tardía. Los resultados del estudio molecular destacan la asociación significativa entre las variantes genéticas

rs3018362 y rs1805034 del gen *TNFRSF11A* y rs11573871 del gen *TNFRSF11B* con el incremento de riesgo a desarrollar EOP así como la influencia en su fenotipo. Asimismo se observó que la presencia del alelo T en el polimorfismo rs6567274 del gen *TNFRSF11A* se asoció con una disminución de riesgo a desarrollar la EOP, así como a un fenotipo más leve con menores complicaciones durante el curso de la enfermedad. En el estudio molecular del gen *SQSTM1* se identificaron diecisiete mutaciones en regiones codificantes del gen, siendo siete variantes genéticas “*missense*” de nueva descripción, asociadas todas ellas a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de la EOP y distribuidas en los diferentes dominios estructurales y funcionales de la proteína p62 favoreciendo así disfunciones en los distintos procesos de señalización celular donde interviene. Estos procesos complejos de señalización celular, dependientes de la proteína p262, como son la supervivencia celular, apoptosis, autofagia, marcaje de proteínas y degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma y la regulación de la respuesta antioxidante se han visto implicados en la patogenia de la enfermedad ósea de Paget.

ABSTRACT

ABSTRACT

Paget's Disease of Bone (PDB) is characterized by a chronic and focal disorder of bone remodeling that leads to variations of the size, the density, the consistency of the affected bones as well as to reduced resistance, favoring the appearance of complications as bone deformities, deafness, osteoarthritis and fractures, causing deterioration of functional capacity and the quality of life. The PDB presents a great variability in its distribution depending on the age, gender, ethnics and geographic area, despite being described in almost all continents, it has been observed that its prevalence and geographic distribution is heterogeneous, with great differences between neighbor regions. Recent studies done in certain geographic areas seem to denote secular changes in terms of prevalence, incidence and severity of the PDB diagnostic, showing a decrease in the last decades. Nowadays there are no studies carried in low prevalence areas that contribute with information about these tendencies and the influence of gender in these changes. The PDB is currently considered a complex and multifactorial disease, in which participate synergistically ambient and genetic factors. The gene which has shown higher susceptibility is the Sequestosome-1 (*SQSTM1*), the mutations described in it would not be able to explain completely the PDB pathogenesis since these mutations are not present in most patients. Besides, the *SQSTM1* gene mutations show incomplete penetrance, emphasizing the role of ambient factors and other modifier genes in the etiology of the disease. The clearest candidates are those that, as *SQSTM1* does, are related to osteoclastogenesis. The RANKL/RANK/OPG system constitutes a key signaling pathway in determining the balance of bone remodeling, being an intercellular communication system that especially regulates osteoclastogenesis. Nowadays, there are few studies about the genetic variations in the *TNFRSF11B* (*OPG*) and *TNFRSF11A* (*RANK*) genes associated with classic PDB as well as the existence of genetic interactions between both genes and the *SQSTM1* gene, that lead to an increase in the risk of PDB or even influencing the phenotype. Therefore, and to investigate the pattern of clinical-epidemiological and genetic behavior of the PDB in our low prevalence population, we propose the following objectives.

The *objectives* were focused in evaluate secular changes in the evolution of the ratio of the new diagnosis of PDB during the study period (1970-2009) and to describe in those

patients differences in terms of severity at the moment of the diagnosis and to determinate the existence of independent predictive factors of severity in the moment of diagnosis, as well as to analyze the importance of the molecular alterations in the *SQSTM1* (p62) gene and the presence of allelic variations in the *TNFRSF11B* (*OPG*) and *TNFRSF11A* (*RANK*) genes both regarding the susceptibility in the development of the PDB and its influence in the phenotype.

Patients and Methods: Descriptive observational ambispective study of patients from Hospital del Mar-Parc de Salut Mar (Barcelona), a low prevalence area. There were included a total of 393 patients, diagnosed and/or in the process during the period between January 1970 to December 2009. Based on the molecular study the genotyping of the 21 polymorphic variants was carried out through MassARRAY®iPLEX Gold technology to study de *TNFRSF11B* (*OPG*) and *TNFRSF11A* (*RANK*) genes as well as performing the *SQSTM1* (p62) gene sequencing in a population of 200 BDP affected patients and 200 hypernormal controls. The statistical analysis was done through SPSS for Windows (v23) and the R software version 2.15.0 for Windows.

Results: In the study, it is highlighted a progressive decrease of the percentage of new diagnostics of PDB concerning the reference population, between 1994 and 2009, pronounced in the ≥ 65 years old group. Thereby, it has been confirmed that the PDB-affected patients show a decrease in the biological activity of the disease, a lower extension of the disease, and a higher age of presentation at the moment of diagnosis, depending on the year of birth and the year of diagnosis. In contrast, it has been observed higher severity at the moment of diagnosis in patients aged between < 45 and ≥ 75 years old at diagnosis. There have been identified 5 independent factors of poor prognosis at diagnosis that are going to favor worse outcomes, as the presence of complications during the disease. We can conclude that at the moment of diagnosis of PDB, the expression of the disease is less severe and happens later. The results of the molecular study highlight the significant association between two SNPs of *TNFRSF11A* gene (rs3018362 and rs1805034) and one of *TNFRSF11B* gene (rs11573871) with the increase of risk of developing PDB as well as the influence in its phenotype. Thereby it was observed that the presence of the allele T in the polymorphism rs6567274 of the *TNFRSF11A* gene was associated with a decrease of the risk of developing PDB, as well as a milder phenotype with lower complications during the course of the disease. In the molecular study of the *SQSTM1* gene, there were identified seventeen mutations in

coding regions of the gene, being seven "missense" genetic variants of new description, associated all of them to a higher susceptibility in the development of the PDB and distributed in the different structural and functional domains of the p62 protein favoring this way dysfunctions in the different cell signaling processes where it intervenes. These complex processes of cell signaling dependent on p62 protein, like cell survival, apoptosis, autophagy, protein marking and protein degradation through the ubiquitin-proteasome system and the regulation of the antioxidant response, have been involved in the pathogenesis of Paget's disease of bone.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

1.1.1. Concepto y aproximación histórica

La enfermedad ósea de Paget (EOP), es considerada la segunda enfermedad más frecuente que afecta al metabolismo óseo, tras la osteoporosis. Se caracteriza por ser un trastorno benigno, crónico y focal del remodelado óseo con una resorción incrementada, secundaria a una disfunción clonal de los precursores osteoclasticos, seguida de una formación osteoblástica de igual intensidad aunque desorganizada y anárquica, que conlleva a una estructura ósea inmadura, no laminar y muy vascularizada, que va a dar lugar a variaciones del tamaño, densidad y consistencia de los huesos afectos así como una resistencia disminuida, ocasionando alteraciones biomecánicas de la misma, lo que facilita la aparición de un hueso más frágil, plexiforme, susceptible a presentar diversas complicaciones como deformidades óseas, artropatía degenerativa por vecindad y una mayor propensión a fracturas^{1,2}

La primera descripción data de noviembre de 1876, previo al descubrimiento de los rayos X en 1895, donde Sir James Paget presentó a la “Medical and Chirurgical Society of London” la descripción de 5 casos, que en conjunto ilustraban, una enfermedad deformante ósea de curso lento, de presentación en la edad adulta y con afectación predominante craneal y en huesos largos localizados principalmente en extremidades inferiores, que denominó «*osteítis deformans*» y la consideró como una enfermedad de naturaleza inflamatoria. Posteriormente, él mismo describe de forma detallada en el “Medical and Chirurgical Transactions” (1877), el caso clínico de un varón de 46 años afecto de “osteitis deformans”, así como el curso de su enfermedad y los resultados de su autopsia³. El paciente consultó por deformidad en la tibia izquierda a los 46 años. Durante los 22 años posteriores, el paciente desarrolló una deformidad craneal, sordera y, finalmente, un osteosarcoma en el radio izquierdo que le ocasionó la muerte a los 68 años. Unos años después, en 1882, Sir James Paget presentó nuevos casos describiendo la entidad como una enfermedad que “*comienza en la edad media de la vida o después y afecta con más frecuencia a los huesos largos de las*

extremidades inferiores, la pelvis y el cráneo. Los huesos se agrandan y se hacen más maleables, y aquellos que soportan peso llegan a curvarse de forma antinatural⁴.

'(the disease) begins in the middle age or later, is very slow in progress, may continue for many years without influence on the general health, and may give no other trouble than those which are due to changes of shape, size and direction of diseased bones ... The bones enlarge and soften, and those bearing weight yield and become unnaturally curved and misshapen ... The disease is attended with pains in the affected bones, pains widely various in severity and variously described as rheumatic, gouty or neuralgic ... The bones examined after death show the consequences of an inflammation ... The softening is associated with enlargement and with imperfectly developed structures, and with increased blood supply⁴.

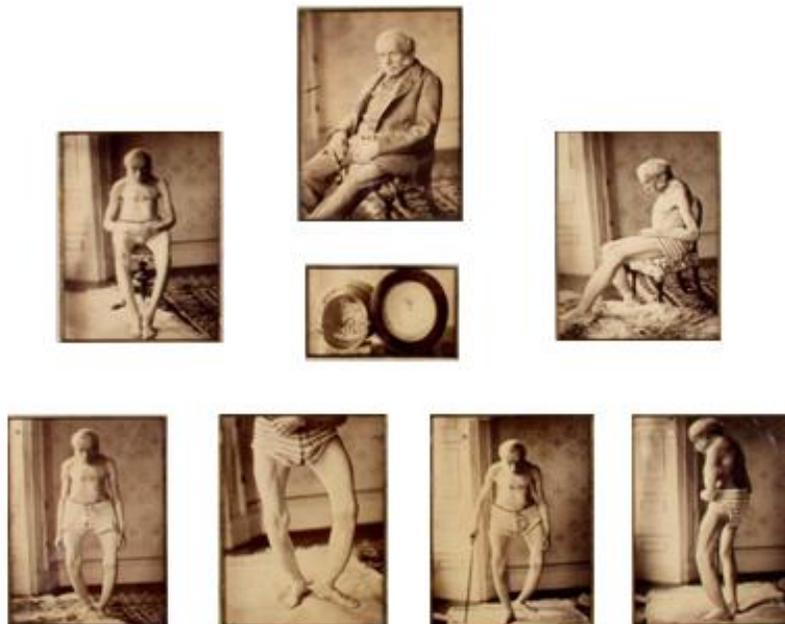


Figura 1. Descripción del primer paciente diagnosticado de “Osteitis deformans”. Fotografía realizada en 1876, seis meses previos al fallecimiento del paciente. [Adaptada de Paget J, 1877]³.

A pesar que ya existían informes de casos similares previos a su primera descripción (Wilks, 1869, Rullier, 1812, Wrany 1867, Czerny 1873), es sin duda, el primero que proporcionó un análisis global y más detallado de esta entidad, para la que no se ha sugerido mejor denominación que la de “Enfermedad Ósea de Paget”. Las últimas observaciones de Sir James Paget acerca de esta dolencia se publicaron en 1889⁵.

Desde la primera descripción de Paget se ha recopilado una gran cantidad de información gracias a una intensa actividad investigadora. Sin embargo, a día de hoy

siguen existiendo interrogantes acerca de la etiopatogenia así como de su prevalencia y distribución geográfica, por lo que por el momento se podría considerar una historia inacabada.

1.1.2. Epidemiología

La EOP es un trastorno focal del metabolismo óseo que afecta principalmente a la población adulta, suele diagnosticarse generalmente por encima de los 50 años, siendo un hallazgo inusual antes de los 40 años, mostrando un ligero predominio de los varones frente a las mujeres, según las series⁶. La prevalencia estimada de la EOP aumenta con la edad, siendo el 1-5% en individuos mayores de 55 años, considerándose la segunda enfermedad metabólica ósea más frecuente después de la osteoporosis^{6,7}.

1.1.2.1 Distribución geográfica

La EOP se caracteriza por presentar una gran variabilidad en su distribución en función de la edad, género, etnia y área geográfica, mostrando un patrón irregular con grandes diferencias entre regiones vecinas^{6,8}.

Uno de los factores de riesgo más importantes asociado al desarrollo de la EOP es el incremento con la edad. La EOP afecta principalmente a la población adulta, suele diagnosticarse generalmente por encima de los 55 años, siendo un hallazgo inusual antes de los 40 años, en estos casos, se asocia a una enfermedad más extensa y severa en el momento del diagnóstico^{1,8,9}. La prevalencia aumenta en las últimas décadas de la vida, el 70% de los casos se diagnostica después de los 60 años, y posteriormente, se duplica con cada década que transcurre, afectando a más de un 8% en los varones y a un 5% de la mujeres a partir de la octava década¹.

En cuanto a la distribución por género, las cifras varían según se trate de estudios poblacionales, en los que suele haber una mayor proporción de varones frente a las mujeres (3:2), o series hospitalarias cortas, en las que la frecuencia es similar en ambos grupos^{1,8}. Esta discreta diferencia en relación al género, se mantiene con la edad. También se ha observado diferencias en cuanto a la distribución esquelética de las lesiones en relación al género, probablemente por una diferente exposición a los potenciales factores ambientales que podrían determinar la localización de la lesión^{1,8}.

A pesar que la EOP afecta principalmente a los caucásicos del noroeste de Europa, también ocurre en otros grupos étnicos. La distribución étnica es heterogénea, siendo poco prevalente en la población negra nativa de África, Japón y Sudeste Asiático, con un predominio en la raza caucasiana anglosajona¹⁰. No se han encontrado diferencias entre la población de raza negra y caucásica de Estados Unidos^{11,12}, aunque es mayor que la encontrada entre la población africana de raza negra¹³. Parece observarse una tendencia a adquirir la prevalencia de las zonas donde se vive después de la primera generación, lo que coincide con la tendencia a la disminución de la prevalencia entre la población británica nacida en Australia respecto a la llegada del Reino Unido. Estos datos son otro argumento para considerar que hay un factor ambiental en la etiología de la EOP.

A pesar que ha sido descrita en casi todos los continentes, se ha observado que su prevalencia y distribución geográfica es heterogénea e irregular, con grandes diferencias entre regiones vecinas (figura 2)⁶. En base a los estudios epidemiológicos realizados en las últimas tres décadas, se ha observado una alta prevalencia en las poblaciones del noroeste de Europa, siendo más elevada en el Reino Unido (5,4%) (2,5% de los varones y 1,6% de las mujeres mayores de 55 años, llegando al 7% en los varones y al 6% en las mujeres mayores de 85 años)^{14,15} así como en regiones que corresponde en gran medida a los patrones de migración europea, principalmente a pacientes de ascendencia británica, siendo común en áreas de Australia²⁴, Nueva Zelanda¹⁶ o Norteamérica (1 - 3% en los mayores de 65 años, alcanzando el 10% en los mayores de 80 años)¹¹ y rara (menos del 1 ‰) en África¹⁷, Japón¹⁸, Sudeste asiático o en los países escandinavos. Y muestra una prevalencia intermedia en Alemania¹⁹, Francia²⁰, Italia²¹ y España (1,21% en la población mayor de 55 años)^{22,23}.

En rasgos generales, en Europa, la prevalencia desciende según pasamos del norte al sur, a excepción de la península escandinava. Y en otros países, como Estados Unidos, también se han descrito diferencias en función de la geografía, siendo más prevalente en los estados del norte de la costa atlántica con una incidencia del 1,48% frente a los del sur (0,26%), así como una menor prevalencia en la población negra o india de ese país¹².

Los últimos datos acerca de la prevalencia de la EOP en España²³, provienen de un estudio poblacional basado en la revisión radiológica de radiografías simple de abdomen en personas mayores de 55 años durante el periodo comprendido entre 2006-

2007, donde participaron 13 centros hospitalarios distribuidos en 18 áreas geográficas, analizando un total de 4528 radiografías, identificándose 44 casos de EOP entre los mayores de 55 años, lo que representa una prevalencia de un 1,0% [IC95%: 0,9-1,3]. El dato de prevalencia fue algo inferior al habitualmente utilizado para España del ~1,3%, que se estimó en la década de los 70, en el estudio de Detheridge²⁰ (basada en una encuesta por correo a radiólogos de varios países europeos).

En este estudio de prevalencia de EOP, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,004$) entre regiones, a pesar de no existir un claro patrón espacial, se detectaron cifras ligeramente inferiores en las zonas costeras, en especial en la zona mediterránea (Andalucía 0,14% (IC 95%: 0-0,41), y cifras superiores en las zonas interiores del país (Castilla la Mancha y Castilla León, en 2,37% (IC 95%: 0,92-3,82). También se observaron diferencias en cuanto al género, se identificó una prevalencia ligeramente superior en hombres (1,16%) frente a mujeres (0,80%), sin presentar significación estadística. En cuanto a la distribución por regiones en función del género, se observó que las cifras más bajas en ambos casos se encontraron en Andalucía 0,25% (IC 95%: 0,00-0,74) y 0%, en hombres y mujeres respectivamente. Mientras que el máximo para los hombres se alcanza en Castilla la Mancha y Castilla León con 4,52% (IC 95%: 1,45-7,59) y para las mujeres ocurre en Aragón, Asturias y Canarias con una prevalencia del 2,12% (IC 95%: 0,28-3,96). También se detectó una clara tendencia creciente y lineal de la prevalencia por grupos de edad, pasando desde el 0,08% (IC 95%: 0,00-0,25) para el grupo de edad entre los 55 y 65 años, hasta el 2,43% (IC 95%: 1,07-3,79) para los mayores de 85 años²³.

En cuanto a los resultados de los estudios de prevalencia realizados en base a la valoración únicamente de la radiografía simple de abdomen, se sugiere que infraestiman un 20% la prevalencia de la EOP, debido a la gran variabilidad de la afectación pélvica en estos pacientes, entre 40-76%, según las series^{21,22,12}. Por este motivo se reestimó la prevalencia de EOP en España, en función de la metodología que mostraba la existencia de un infradiagnóstico en la quinta parte de los pacientes si esta valoración se realizaba mediante radiografía simple de abdomen, por consiguiente la verdadera prevalencia de EOP en España en mayores de 55 años, se estableció en el 1,21% (IC 95%: 0,95-1,6%) siendo 1,5 % en hombres (IC 95%: 1-2,1%) y en mujeres de 1% (IC 95%: 0,7-1,5%)²².

Además de la peculiar distribución de la enfermedad entre los distintos países, en cada uno de ellos existen diferencias marcadas entre regiones vecinas, apareciendo zonas donde se produce una acumulación significativa de casos, o focos de alta prevalencia ²⁵. El foco más conocido es la región urbana de Lancashire en Gales con una prevalencia en la población mayor de 55 años del 8,3%, frente al 5,4% del conjunto de Gran Bretaña^{14,15}, no se ha observado la existencia de características climáticas o geológicas exclusivas que pudieran dar algún atisbo de explicación en cuanto a esta distribución geográfica de la EOP.

En España son dos los focos de alta prevalencia descritos, son zonas geográficas de ámbito rural con gran aislamiento geográfico y marcada endogamia, como son: Sierra de la Cabrera en la provincia de Madrid, con una prevalencia del 6,4% % (IC95% 4,8%-7,9%) y en la comarca de Vitigudino (Salamanca) con una prevalencia del 5,7% (IC95% 4,5%-6,9%)^{23,25}. Otro foco rural de alta prevalencia se ha descrito en Campania y Toscana, en el sur de Italia^{21,26,27}.

En la actualidad, no se disponen de datos globales sobre la incidencia de la EOP, pero gracias a la estimación de la prevalencia podemos intuir un incidencia de 0,7 a 1,1 por 10.000 personas/año en la población mayor de 55 años, aumentando de forma progresiva y paralelamente con la edad²⁸.

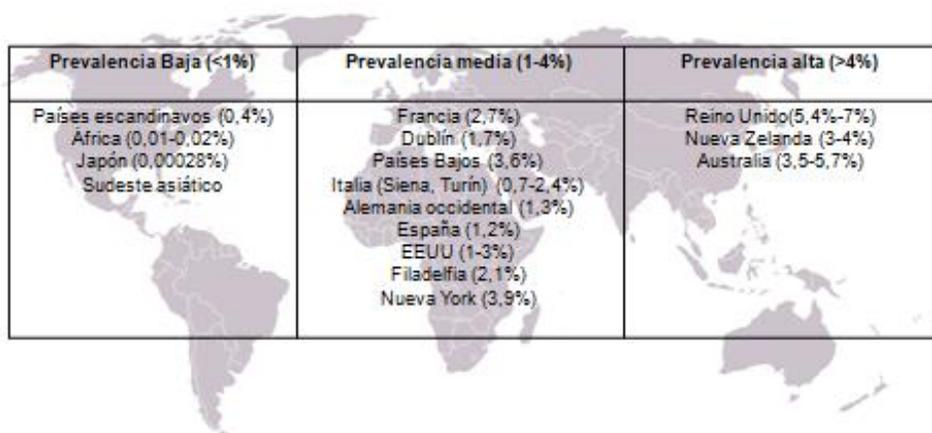


Figura 2. Prevalencia de la EOP en las diferentes áreas geográficas.

1.1.2.2 Cambios seculares

Recientes estudios sugieren que la prevalencia, incidencia y la severidad de la EOP están disminuyendo en la mayor parte de las regiones estudiadas, siendo más significativo este descenso de prevalencia e incidencia en el Reino Unido, Nueva Zelanda y en diferentes ciudades Europeas (Austria y Dinamarca (70%), España (55%), Grecia (40%), Suecia (25%), Francia (24%)) en los últimos 40 años. Su frecuencia parece estar disminuyendo de forma más marcada en las regiones conocidas como de alta prevalencia, pero no ocurre lo mismo en todas las zonas analizadas^{6,28,29,30,31}. En Reino Unido, el descenso de la prevalencia fue más marcado en el foco de Lancashire, asimismo, en España, concretamente en la región de Vitigudino (Salamanca), foco de alta prevalencia de esta entidad, se ha observado una disminución de su prevalencia en el periodo comprendido entre 1998 y 2009, no observándose esta tendencia en el resto de la provincia de Salamanca³¹. En Auckland (Nueva Zelanda), la prevalencia disminuyó un 49% entre el periodo de 96-2004 en el grupo de edad 55-59 años, siendo menor esta disminución de un 4%, en el grupo de mayores de 70 años³². Sin embargo, en Turín, se ha observado un incremento de prevalencia (0,43-0,9%) en individuos mayores de 75 años en las últimas décadas (1986-2002), sin objetivarse cambios en los pacientes menores de 75 años²¹. Asimismo se objetivó un aumento significativo de prevalencia (0,42% en 2006 a 1,27% en 2009) en Recife, en el noreste de Brasil, durante el periodo 2006-2009³³. También se ha observado un aumento de incidencia de 6,9/100.000 persona-año en el periodo 1950-1959 a 12,6/100.000 persona-año en el periodo 1960-1979 en el condado de Olmsted (Estados Unidos) con una disminución posterior de 5,4/100.000 persona-año en el periodo 1990-1994²⁸. Este registro se caracteriza por presentar el tiempo de seguimiento más largo publicado, donde se estudiaron los cambios seculares durante un periodo de 44 años, entre 1950-1994. No obstante, en Reino Unido, con el registro más amplio publicado, en torno a 2465 pacientes incluidos, se mostró una clara caída en la incidencia de EOP 1,1 a 0,7/10.000 personas-año entre 1988 y 1998²⁸.

En cuanto a la severidad en el momento del diagnóstico en las últimas décadas, también se ha observado un descenso de la gravedad de la afección ósea al diagnóstico y de las complicaciones secundarias, tanto en Nueva Zelanda²⁹, Reino Unido³⁴, como en España³⁵, pero datos procedentes de Italia³⁶ y EEUU³⁷, no mantienen

esta misma tendencia, no encontrando diferencias en el número de localizaciones o en la afectación esquelética en función del año de nacimiento. Incluso en Campania (Italia), se ha observado un aumento de gravedad clínica en el momento del diagnóstico durante los últimos años²⁶.

Las tasas de mortalidad secundarias a la enfermedad ósea y la degeneración sarcomatosa, también se ha constatado una disminución desde 1950, y publicaciones recientes indican que esta tendencia persiste en el tiempo^{6,38}, por lo que estos datos apoyarían la hipótesis de la existencia de una reducción en la severidad de la EOP.

Las razones por las cuales se explicaría un descenso de la prevalencia, incidencia y severidad en las últimas décadas, e incluso más marcada esta reducción en los focos de alta prevalencia como son las regiones de Lancashire y Vitigudino, son difíciles de entender. Se han propuesto algunos argumentos posibles, como cambios en la estructura étnica debido a flujos migratorios procedentes de países de baja prevalencia, mejoría en la alimentación con suplementación de vitamina D, menor exposición a toxinas ambientales¹²⁹ y tabaquismo⁹⁸, estilo de vida sedentario ocasionando menos sobrecargas mecánicas, menos traumatismos⁹⁰ y menos lesiones óseas y otro factor medioambiental precipitante podría ser la menor exposición a zoonosis debido a la emigración de las áreas rurales a las urbanas y menores casos de infecciones gracias a los programas de vacunación poblacional⁶.

Una de las grandes dificultades que se enfrentan los estudios epidemiológicos de la EOP, es la menor frecuencia de las formas sintomáticas en comparación con las formas clínicamente silenciosas. También va a depender de la metodología utilizada para la detección de los casos de EOP, por lo que la prevalencia tendrá gran variabilidad. Es decir, la utilización de técnicas más sensibles como la gammagrafía ósea, detectará mayor número de casos frente al uso de la radiografía simple de abdomen. Esta variabilidad en los estudios poblacionales va a depender de la herramienta de diagnóstico utilizada, dando como resultado un sesgo de detección, que debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados del estudio. Un ejemplo de este hecho, es el aumento en la incidencia de EOP documentado en Olmsted (Estados Unidos) entre 1960-1979 atribuido al uso de forma rutinaria de determinaciones de fosfatasa alcalina sérica, que permitieron la detección de formas asintomáticas de EOP²⁸.

1.1.3. Clínica

1.1.3.1. Manifestaciones clínicas y complicaciones

La aparición de las manifestaciones clínicas va a depender de la localización esquelética, de la extensión y actividad de la enfermedad, siendo la mayor parte de los casos asintomáticos (>70%) durante el curso de la enfermedad²⁸.

La clínica, consecuencia del elevado remodelado óseo y del aumento de vascularización del tejido óseo afecto, puede manifestarse como dolor óseo y deformidad ósea, a las que se suman las acontecidas por las complicaciones como la artropatía por vecindad, fracturas patológicas, sordera y síntomas neurológicos³⁹.

Las principales localizaciones afectadas son la pelvis (58-80%), la columna (40%), el fémur (32%), el cráneo (20-30%) y la tibia (16-20%). En un segundo nivel se encuentran la escápula (5%), la clavícula (4%), las costillas (4%) y los huesos de la cara. Los huesos de los pies (2%) y los de las manos (< 1%) rara vez se ven envueltos⁴⁰.

En el 25 % de los casos, la enfermedad se presenta de forma monostótica (afectación de un solo hueso), mientras que en el 75% de los pacientes aparece de forma poliostótica (afectación de varios huesos), con una media de 3 lesiones óseas por paciente y con una afectación asimétrica, generalmente en huesos no contiguos⁴¹.

Durante la evolución no suelen aparecer lesiones óseas diferentes a las diagnosticadas inicialmente. Aún así existe una pequeña evidencia en la literatura, de la aparición de estas lesiones de forma asincrónica⁴².

El dolor, atribuido a la distensión perióstica, al aumento de la vascularización y a las microfracturas, es el síntoma más frecuente. El dolor de origen óseo se describe como sordo, profundo, poco localizable, de predominio nocturno y con independencia de la carga y de los movimientos. Suele coincidir con un aumento de la actividad de la enfermedad, más frecuentemente durante la fase lítica. Mucho más frecuente es el dolor secundario a complicaciones, especialmente por atrapamiento neurológico o artropatía por vecindad²⁹. Las deformidades esqueléticas son más evidentes en los huesos largos, el cráneo y la clavícula. Los huesos largos se incurvan por el aumento de volumen y la maleabilidad de los huesos afectados. El aumento del tamaño óseo y las deformidades craneofaciales pueden transformar la apariencia física del paciente, ocasionándole una apariencia leonina³⁹.

Las complicaciones más frecuentes derivadas de la EOP comprenden ^{39,42,43,44,48,49,50}:

- Artropatía por vecindad secundaria a una alteración del hueso subcondral y causa más frecuente de dolor. Afecta fundamentalmente a las caderas –coxopatía pagética-, rodillas y hombros, con una incidencia para las mismas de un 47,4%, 14,8% y 8,6%, respectivamente.

- Fracturas patológicas, debido a la defectuosa transmisión de las cargas, característico del hueso pagético. Las fracturas se suelen localizar en áreas expuestas a mayor presión mecánica (convexidad externa del fémur y anterior de la tibia o pelvis y en la parte central de las vértebras).

- Complicaciones neurológicas secundarias a una compresión de estructuras neurológicas, por crecimiento óseo (mielopatías, radiculopatías) o por insuficiencia vascular debido a una hipervascularización ósea. La afectación craneal puede desencadenar síndromes del tronco cerebral o hidrocefalia normotensiva.

- La sordera de predominio neurosensorial, es muy frecuente cuando se afecta el hueso temporal del cráneo. Sin embargo lo más frecuente es que se produzca la afectación de los pares craneales a su paso por la base del cráneo, concretamente la afectación del VIII par craneal, que ocurre en un 12%-50% de los pacientes, según las series.

- La insuficiencia cardíaca congestiva de alto gasto se atribuye al “robo” parcial del volumen sanguíneo circulante por la hipervascularización en las zonas afectas, que actuarían como fístulas.

- Trastornos metabólicos como las alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico, por la gran actividad resortiva ósea que presentan y por las fracturas e inmovilizaciones a las que pueden estar sometidos estos pacientes. También se ha objetivado la presencia de adenomas paratiroides en el 3-6% de los pacientes, ocasionando un hiperparatiroidismo primario con hipercalcemia secundaria. La hiperuricemia y la presencia de artropatía gotosa, se ha documentado en estos pacientes, secundario a un recambio elevado con un metabolismo purínico aumentado. Asimismo, también se ha encontrado una débil asociación positiva de la EOP con la condrocalcinosis.

- Alteraciones maxilofaciales y bucodentarias por afectación de los huesos faciales, maxilares y malares produciendo: un síndrome temporomandibular, una malaoclusión dentaria, una hipercementosis con mayor pérdida de piezas dentales, un

estrechamiento de la vía aérea superior por agrandamiento del paladar, cambios en el tono de la voz y alteraciones en la masticación y deglución.

- La complicación más temida, la degeneración sarcomatosa del hueso pagético, siendo más frecuente el osteosarcoma, con una incidencia menor a 0,1%, ocurre más frecuentemente en los varones, con edades superiores a los 50 años y con enfermedad polioestótica asociada. Por orden de frecuencia las zonas que más se afectan son la pelvis, el fémur, el húmero, la tibia y el cráneo, no es frecuente la afectación vertebral. Tiene un mal pronóstico por la frecuente extensión local y desarrollo de metástasis pulmonares^{43,44}, con una supervivencia a los 5 años de 0-10% según las series.

1.1.3.2. Cambios seculares en la clínica al diagnóstico

A pesar de las evidencias documentadas del descenso en la prevalencia e incidencia de la EOP, también se han detallado cambios seculares en el fenotipo de la EOP al diagnóstico. En base a una revisión sistemática de la literatura acerca de cambios en el modo de presentación de la EOP, donde se incluían 25 estudios procedentes de diferentes poblaciones (Reino Unido, Brasil, China, España, EEUU, Irlanda, Rusia, Italia, India, Nueva Zelanda, Japón)³⁹ objetivaron que el dolor óseo fue el síntoma más frecuente en todos los estudios, con una frecuencia que oscilaba del 40% en Sudamérica al 70% en la población India. La afectación monostótica al diagnóstico se presentaba en el 9% en la India frente al 50% en Japón y en Reino Unido. La presencia de deformidad en el momento del diagnóstico se objetivó en el 16% en Japón, Reino Unido, Sudamérica y entre el 24,3% y el 33,7% en Europa, EEUU e India. La presencia de sordera presentó una frecuencia al diagnóstico entre 5,5% al 11,2% de la población pagética. La frecuencia de fracturas al diagnóstico mostró una gran variabilidad según regiones, mostrando una frecuencia menor en Sudamérica con un 2,9% frente a un 27% en India. Al observar estas grandes diferencias de frecuencia de fracturas en las diferentes poblaciones, se realizó un estudio para evaluar la existencia o no de correlación con las fracturas de cadera del mismo país, no observando correlación entre ambas frecuencias. Únicamente existió correlación en la India entre la frecuencia de fracturas en la población EOP y la frecuencia de fracturas de caderas en la población general ($r=0,82$, $p=0,007$ en mujeres y $r=0,67$, $p=0,048$ en hombres)³⁹.

En relación al análisis sobre tendencia secular en el modo de presentación de la EOP en la población de descendencia europea durante tres periodos de estudio (previo al

2000, 2000-2009, y posterior al 2010), se objetivó la presencia de dolor óseo más frecuente (65,3%) en el último periodo del estudio (2010-2014) comparado con los previos (50,4% en 2000-2009 y 48,3% previo al 2000), siendo estadísticamente significativo. A diferencia de la fractura al diagnóstico fue menos frecuente en el último periodo con una frecuencia del 3,8%, respecto a los previos (6,5% en 2000-2009 y 10,8% previo al 2000), mostrando significación estadística. No se observó un claro patrón, en relación a la deformidad, siendo menor en el último periodo de estudio, con una frecuencia de 10,1% respecto a los previos (26,5% en 2000-2009 y 21,8% previo al 2000). La prevalencia de sordera fue similar en los periodos más recientes (11,1% y 6,7%), frente al 2,4% del primer periodo, siendo estadísticamente significativo³⁹.

La disminución de la frecuencia de la EOP y la disminución de la mortalidad relacionada con la EOP en los últimos 40 años se asocian con una disminución en la gravedad clínica de la enfermedad y con la desaparición casi completa de su complicación más grave, como es la transformación sarcomatosa de la enfermedad pagética⁴⁷. En base a las evidencias publicadas, existe una reducción de la frecuencia de complicaciones malignas en las últimas décadas, mostrando una mayor supervivencia a la esperada en la población general⁴⁵. Asimismo, los tumores óseos de células gigantes, solitarios y multifocales, que habitualmente se desarrollan en localizaciones pagéticas y en pacientes afectados de EOP con un fenotipo grave, presentan una tendencia descendente, incluso en el sur de Italia, donde es particularmente común⁴⁶. En contraposición, el desarrollo de metástasis óseas, principalmente de cáncer de próstata en lesiones pagéticas, facilitado por el aumento de la vascularización de estas, se mantiene sin cambios en las últimas décadas⁴⁷.

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la EOP es casual en el 75% de los casos y se lleva a cabo en base a la sospecha clínica, a la elevación de los marcadores de remodelado óseo, fundamentalmente niveles elevados de fosfatasa alcalina (FA) no explicados por otras patologías o bien por la presencia de cambios iconográficos característicos (incremento de densidad heterogénea con áreas escleróticas, desdiferenciación corticomédular, crecimiento óseo y, frecuentemente, osteólisis) de esta enfermedad⁴⁰

La elevación de los marcadores de remodelado óseo reflejan las alteraciones del metabolismo óseo. La FA total (FA) y la isoenzima ósea de la FA (FA ósea), el

propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (P1NP), como marcadores de la formación ósea y el telopéptido aminoterminal del colágeno tipo I (NTX) y el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX), como marcadores de resorción ósea, se encuentran elevados en las fases de actividad metabólica de forma proporcional, lo que refleja el acoplamiento entre los procesos de formación y resorción. El resto de los parámetros metabólicos fosfo-cálcicos son normales en los pacientes afectos de EOP, salvo en pacientes inmovilizados, con enfermedad extensa, o coexistencia de hiperparatiroidismo primario.

Debido a su amplia disponibilidad, su baja variabilidad, alta sensibilidad y su bajo coste, la FA es el mejor marcador de uso clínico para la EOP, dado que refleja la extensión de la enfermedad y evalúa la actividad de la misma, con buena correlación respecto al índice de Coutris⁵¹ y al índice de Renier⁵², respectivamente. El P1NP es más específico y puede ser útil como prueba de segunda línea cuando la FA es normal o está levemente elevada, o cuando existe elevación de otras enzimas hepáticas o una afectación monostótica y se sospecha EOP activa⁴¹.

A pesar de esto, en un reciente metaanálisis, proponen el P1NP como marcador de primera línea para monitorizar la actividad de la enfermedad, por su sensibilidad y especificidad, incluso en situaciones de enfermedad con extensión limitada, respuesta a terapia con bifosfonatos (BFs) y en la detección precoz en recaídas, considerando buenas alternativas, FA, FA ósea y CTX, en pacientes previamente no tratados o cuando el P1NP no esté disponible⁵³.

La expresión radiológica de la EOP es el fiel reflejo de la alteración desordenada del metabolismo óseo característica de esta enfermedad. Los hallazgos obtenidos en la radiología simple y la localización de los mismos son habitualmente concluyentes, como para permitir establecer la fase radiológica, así como el diagnóstico de la misma.

Las alteraciones en la imagen radiológica, suelen ser la clave esencial del diagnóstico, ya que sus características son fácilmente reconocibles y se corresponden con tres fases bien diferenciadas de hiperactividad celular: una primera *fase lítica* donde predomina la resorción osteoclástica, a la que le sigue otra de equilibrio entre resorción osteoclástica y formación osteoblástica, llamada *fase mixta*, y por último una de osteoformación osteoblástica predominante, que se define como *fase esclerosa*. Las imágenes varían según la fase evolutiva y el tipo de hueso afecto (tabla 1, figura 3)^{42,58}.

La lesión no suele afectar al hueso en toda su extensión y el límite entre la zona sana y patológica aparece una imagen lítica (en forma de “V invertida” o “V de Brailsford”), que se corresponde con el frente de progresión de la enfermedad, característica en la diáfisis de huesos largos. La tomografía axial computerizada y la resonancia magnética no suelen aportar más datos que la radiología simple, aunque pueden ser útiles en algunos pacientes con complicaciones como estenosis del canal medular o degeneración sarcomatosa⁵⁴.

La gammagrafía ósea con BF marcados con tecnecio-99m (^{99m}Tc), refleja el turnover óseo con una elevada sensibilidad pero escasa especificidad para el diagnóstico de las diferentes enfermedades metabólicas óseas. Esta técnica ofrece imágenes de aumento de captación (3-5 veces la del hueso normal) en zonas de incremento de la vascularización y actividad osteoblástica. Aunque es poco específica, tiene una gran sensibilidad para detectar lesiones, siendo capaz de detectar hasta 50% más lesiones que la radiografía convencional, esto es debido, a la información funcional que aporta, con lo que es capaz de detectar anomalías que aún no han provocado una alteración morfológica, visible en la radiología^{55,59}. Y a diferencia de la información que nos aporta la radiología, esta técnica no puede discernir entre los diferentes estadios evolutivos radiológicos. Por lo tanto, esta técnica se emplea tanto para el diagnóstico, para el estudio de extensión como para la monitorización terapéutica mediante la gammagrafía cuantificada.

En la literatura se detallan unas imágenes que se corresponden a hipercaptaciones gammagrafías con unas características morfológicas muy peculiares, probablemente patognomónicas, que pueden facilitar el diagnóstico pudiendo evitar morbilidad al paciente y reducir costos socio-sanitarios. Estas imágenes gammagrafías localizadas en la columna vertebral presentan una morfología característica en “corazón” y en “trébol”, la primera por afectación predominante de los pedículos y de la apófisis espinosa y la segunda por afectación del cuerpo vertebral y de la apófisis espinosa (figura 4). Ambas imágenes corresponden a distintas fases evolutivas de un mismo proceso en el tiempo. La sensibilidad de esta imagen gammagrafía para detectar la EOP fue del 44% (IC95% 34,0-55,3) y su especificidad del 100 % (IC95% 98,2-100)⁵⁶.

La biopsia ósea no suele ser necesaria para el diagnóstico, aunque puede ser útil para el diagnóstico diferencial con diferentes entidades como la displasia fibrosa, osteomielitis crónica y procesos neoproliferativos. Los hallazgos más característicos son la presencia

de trabéculas anómalas, las líneas de cementación irregulares con la típica imagen “en mosaico”, el aumento de la vascularización y el incremento del número y tamaño de los osteoclastos⁵⁷.

Tabla 1. Imágenes radiológicas de la EOP según su localización. [Adaptada de Cundy T, 2008]^{42,58}

Hallazgos radiológicos característicos
<p>Engrosamiento cortical (formación subperióstica)</p> <p>Pérdida de la diferenciación entre la cortical y la medular</p> <p>Acentuación (engrosamiento o rarefacción) de las trabéculas</p> <p>Osteolisis en diáfisis y esclerosis en metáfisis</p> <p>Aumento del tamaño de los huesos (formación subperióstica)</p>
Cráneo
<p>“Osteoporosis circumscripta” en cráneo (frontal y/o occipital)</p> <p>Imagen algodonosas “Cotton wool” (múltiples aéreas radiodensas circunscritas que van confluyendo con bordes definidos, por debajo del díploe)</p> <p>Desaparición de la tabla interna y externa</p> <p>Engrosamiento del díploe</p> <p>Esclerosis de la base del cráneo</p>
Huesos largos
<p>Frente de progresión lítico de la enfermedad en la diáfisis. “V invertida” o “V de Brailsford”</p> <p>Incurvaciones lateral del fémur y anterior de la tibia</p> <p>Fracturas en forma de fisuras corticales en huesos largos</p> <p>Fracturas de estrés transversales en huesos largos</p>

Pelvis
<p>Engrosamiento trabecular en el anillo pelviano interno (sacro e ilion)</p> <p>Engrosamiento de la línea iliopectínea (iliopubiana) en pelvis</p> <p>Esclerosis y aumento de la rama isquiopúbica en pelvis</p> <p>Protusión acetabular con artropatía degenerativa coxofemoral sin evidencia de osteofitos</p>
Columna vertebral
<p>“Vértabras en marco”, con esclerosis de la cortical</p> <p>Engrosamiento trabecular de las vértebras</p> <p>Vértabras hiperdensas con esclerosis homogénea (“vértebra en marfil”)</p> <p>Aumento del diámetro vertebral interpedicular y anteroposterior</p>



Figura 3. Imágenes radiológicas de la EOP según su localización y la fase evolutiva (lítica, mixta, esclerosa) del hueso afecto. Imágenes procedentes de los pacientes afectados de EOP de nuestra serie.

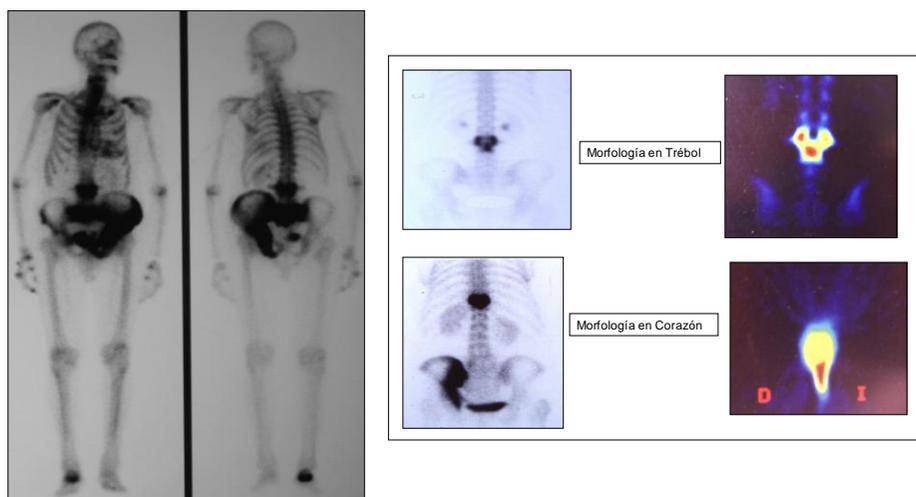


Figura 4. Gamagrafía ósea con Tc99m (^{99m}Tc) /SPECT óseo, en la enfermedad ósea de Paget. Imágenes procedentes de los pacientes afectados de EOP de nuestra serie⁵⁶.

1.1.5. Tratamiento farmacológico y quirúrgico

1.1.5.1. Tratamiento farmacológico

Los objetivos terapéuticos de la EOP son el control de las manifestaciones clínicas, normalización de los marcadores de remodelado óseo, todo ello sin alterar la mineralización y con la finalidad de restituir la estructura ósea a la normalidad, así como limitar la progresión de la enfermedad y prevenir las futuras complicaciones^{55,59}. El tratamiento está recomendado en aquellos pacientes sintomáticos o en pacientes asintomáticos con enfermedad biológicamente activa^{55,59}. Esta última está bajo debate, dado que la intervención terapéutica precoz, por el momento carece de evidencia, para la prevención de complicaciones.

A pesar de la existencia de controversia a la hora de establecer las indicaciones terapéuticas. Las directrices establecidas en las guías de práctica clínica están basadas en opiniones de expertos, consideraciones teóricas, estudios observacionales y ensayos terapéuticos a corto plazo. Estas guías^{55,59,60,61,62} coinciden en señalar como indicación absoluta el tratamiento de los pacientes sintomáticos, con dolor óseo primario y con

enfermedad metabólicamente activa, insuficiencia cardiaca por alto gasto, síndromes neurológicos compresivos, fisuras corticales, las fracturas completas, la hipercalcemia, lesiones pagéticas en localizaciones susceptibles a complicaciones graves y como prevención en las hemorragias intraoperatorias en los pacientes que van a ser sometidos a cirugía electiva sobre un hueso pagético.

Algunos autores consideran indicado el tratamiento de pacientes en fase precoz para prevenir el desarrollo de la enfermedad, ya que los BFs revierten las lesiones líticas, restablecen el remodelado óseo, mejoran la histología ósea y el dolor pagético⁷⁵. Además podrían limitar el desarrollo de deformidades óseas en huesos largos que soportan peso y en huesos faciales, es decir prevenir o disminuir las complicaciones. Aunque no hay estudios que lo confirmen, en pacientes con enfermedad activa podría prevenirse la aparición o la progresión de diversas complicaciones como la artropatía por vecindad, la sordera o la compresión neurológica, especialmente la intrarraquídea^{39,76}.

A día de hoy, no existe suficiente evidencia en el tratamiento preventivo de complicaciones en pacientes asintomáticos. En el estudio PRISM⁶³ y en su extensión a 3 años, donde se compararon dos estrategias de tratamiento con BFs, con el objetivo de determinar si la estrategia intensiva, en la que se trataban pacientes asintomáticos pero con actividad bioquímica, era superior al grupo que recibió tratamiento sintomático, en la prevención del desarrollo de complicaciones futuras. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al número de fracturas, necesidad de procedimientos ortopédicos, pérdida de audición ni en una mejora de la calidad de vida, por lo que se ratifica que la indicación terapéutica se debe focalizar en los síntomas, en lugar de la normalización de los marcadores de remodelado óseo. A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, se debe tener en cuenta que en el estudio existen limitaciones en el diseño, escaso tiempo de seguimiento, así como la no utilización del ácido zoledrónico entre los tratamientos del estudio, siendo este el fármaco más potente de los que disponemos en la actualidad.

Siguiendo en esta misma línea de estudio, conocemos que los BFs, a día de hoy, no pueden revertir las complicaciones una vez estas estén establecidas, por lo que se propuso que si el tratamiento con BFs en fases preclínicas podría eliminar los osteoclastos pagéticos y evitar así el desarrollo de la enfermedad, antes que el daño estructural haya ocurrido. Esto podría ser interesante especialmente en los sujetos con mayor riesgo, como son los hijos portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1* de

padres afectados de EOP. Actualmente, se encuentra en desarrollo un ensayo clínico con ácido zoledrónico en individuos portadores de la mutación en el gen *SQSTM1* sin evidencia clínica ni iconográfica de la EOP, es el estudio ZIPP (Zoledronate in the Prevention of Paget's disease; ISRCTN11611770), cuyos resultados podrían aclarar la posibilidad si los BFs pueden prevenir e incluso retrasar el inicio de la enfermedad.

La base del tratamiento de la EOP es la utilización de agentes antirresortivos con el fin de disminuir el elevado recambio óseo y la actividad del osteoclasto, mediante la apoptosis de los osteoclastos maduros y el bloqueo en la diferenciación de las células precursoras comunes. A lo largo de los años se han utilizado distintos fármacos, uno de los primeros, fue la calcitonina, introducida en 1968, con capacidad de reducir la sintomatología y la expresión de los marcadores de remodelado óseo (MRO), pero por la aparición de recaídas tras el cese del fármaco, respuesta parcial, resistencia adquirida, vida media corta y su efecto plateau aproximadamente a los 4-6 meses, fue sustituida por la aparición de los BFs a una utilización marginal⁷⁴. El etidronato fue el primer BF que se utilizó, en 1973, pero se limitó su administración por la toxicidad, a causa de las alteraciones de la mineralización que ocasionaba cuando se administraba a dosis altas durante periodos prolongados^{72,73}. También se objetivó reactivaciones precoces de la actividad de la enfermedad y aparición de resistencias en algunos pacientes⁷³. Durante los siguientes 35 años, los BFs fueron progresivamente incorporados en la práctica clínica, cada vez con una mayor potencia y mayor duración del efecto.

En la actualidad los BFs son el tratamiento de elección, son análogos sintéticos de los pirofosfatos inorgánicos con potencia antirresortiva y actúan disminuyendo el remodelado y la resorción ósea, los cuales tienen gran afinidad por la hidroxiapatita y fosfato cálcico. Según su estructura se clasifican dependiendo de si contienen un grupo amino o no: los no nitrogenados (etidronato, clodronato o tiludronato) y los nitrogenados (pamidronato, risedronato, alendronato o zoledronato), habiendo demostrado estos últimos un mejor perfil de eficacia y de seguridad.

Los BFs comercializados en España con aprobación para su uso en la EOP son (tabla 2): pamidronato, risedronato y ácido zoledrónico (aminados) y del grupo de no aminados el etidronato y el tiludronato. Existen otros BFs que han demostrado eficacia en la EOP pero no se han comercializado con esta indicación en nuestro país (alendronato, ibandronato, neridronato, olpadronato y clodronato).

En la actualidad, el fármaco de primera línea y que más se utiliza por su eficacia, seguridad, y fácil administración y cumplimiento terapéutico es el ácido zoledrónico (AZ). Debido a su estructura singular, aminobifosfonato de tercera generación, compuesto por 2 átomos de nitrógeno en un anillo heterocíclico imidazólico, presenta una gran afinidad a la hidroxiapatita y fosfato cálcico y una potente acción inhibitoria frente a la farsenil pirofosfato sintetasa (FPP), enzima clave en la ruta metabólica del mevalonato, involucrada en los procesos esenciales de formación, función y supervivencia del osteoclasto. Existe una clara correlación entre la potencia antirresortiva y su capacidad para inhibir a la FPP sintetasa. No muestra efectos adversos sobre la mineralización ósea, con una preservación de la histología ósea normal, aumento de la densidad mineral y la resistencia ósea.

El AZ ha demostrado en diferentes ensayos preclínicos una potencia antirresortiva extremadamente elevada (potencia relativa inhibitoria de la resorción metafisaria en ratas 10.000 veces superior al etidronato y 300 veces superior al pamidronato en la resorción ósea in vivo), y sin evidencia de efectos adversos sobre la mineralización ósea^{64,65}. Una única infusión de 5mg de AZ, ha demostrado una excelente respuesta terapéutica en función de los parámetros de remodelado óseo, con normalización de la actividad a corto-medio y largo plazo, de forma más rápida, marcada y mantenida que otras terapias convencionales utilizadas para la EOP⁶⁶. En un ensayo clínico aleatorizado de 6.5 años de duración, en una población de pacientes afectados de EOP moderada-grave con niveles de FA al menos dos veces el límite superior de la normalidad, una única dosis de AZ alcanzó la respuesta terapéutica (definida como normalización de FA, o una reducción de al menos el 75% del exceso de FA) en el 98% de los pacientes en los primeros 6 meses del estudio⁶⁶. Durante el periodo de seguimiento del estudio, se observó menos del 1 % de los pacientes presentaron recaída (definida como un aumento de FA del 20% de su valor previo al inicio del tratamiento) a los 6 años y medio de la única infusión endovenosa de AZ y un 12.5% de los pacientes mostraron alguna pérdida de respuesta terapéutica⁷¹.

Uno de los efectos adversos más comúnmente descritos en los aminobifosfonatos parenterales es el síndrome pseudogripal, por la siguiente activación de las células T gamma delta (γ/δ) por los sustratos inhibidos en la vía del mevalonato, favoreciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6, TNF-alfa, siendo estas responsables de los síntomas.

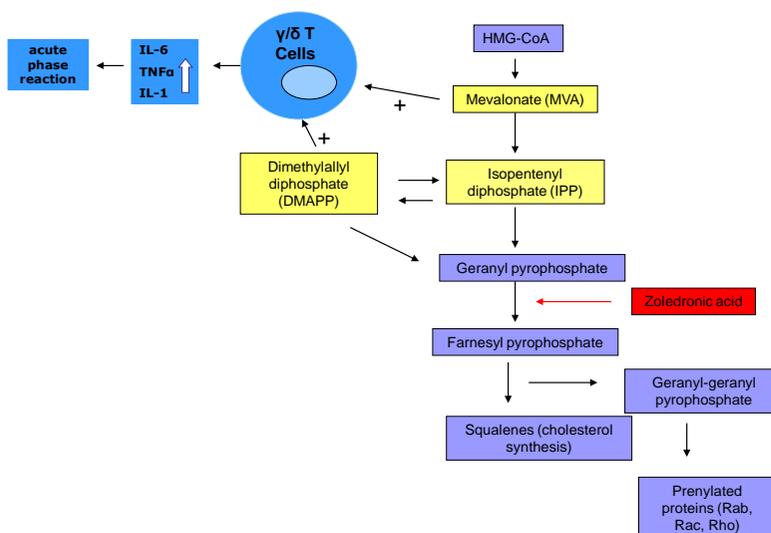


Figura 5. Ácido zoledrónico y la vía del mevalonato.

Se han comunicado buenos resultados en algunas experiencias aisladas con otro antirresortivo potente como el denosumab (Ac monoclonal anti-RANKL), sobretodo en pacientes con insuficiencia renal asociada, pero por el momento, no está autorizado para esta indicación⁶⁷.

Otro aspecto fundamental en el tratamiento de la EOP es la suplementación con calcio (1.000 mg) y vitamina D (400-800 UI) a los pacientes que reciban tratamiento con antirresortivos con el fin de evitar la hipocalcemia y el hiperparatiroidismo secundario.

Monitorización de la respuesta terapéutica

En los casos sintomáticos, el indicador de la eficacia terapéutica es el alivio de las manifestaciones clínicas. En el resto de los casos, se acepta por la mayoría de los autores la recomendación de seguir la respuesta terapéutica a través de los MRO, siendo la FA suficiente, en la mayor parte de los casos. En situaciones con afectación monostótica con FA normal o en pacientes con hepatopatía se recomendaría la utilización de marcadores más sensibles como la FA ósea o el P1NP. En relación al papel de la gammagrafía ósea en la monitorización de la respuesta terapéutica, esta técnica ha quedado relegada a situaciones especiales, por la radiación a la que se somete el paciente y por el retraso de respuesta aproximadamente de 6 a 12 meses respecto a la respuesta con MRO.

Aunque el objetivo terapéutico ideal sería la normalización de la FA, en los últimos ensayos clínicos se considera una buena respuesta terapéutica la disminución de al menos el 50-75 % de los valores previos al tratamiento^{69,71}.

No se recomienda repetir el tratamiento antes de los 6 meses del tratamiento previo, debido a que el efecto del tratamiento con BFs aparece generalmente a los 3 o 6 meses desde el inicio. La principal indicación de un nuevo ciclo de tratamiento es la reaparición de los síntomas. También es aconsejable cuando aparezca una nueva lesión radiológica lítica. Algunas guías proponen tratar nuevamente cuando se observe una reactivación con un aumento de la FA por encima del 25 % del valor superior de la normalidad en pacientes que consiguieron la normalización, o del 25 % del valor alcanzado después del tratamiento en los que no llegaron a la normalización⁷⁰.

En relación a los intervalos de monitorización con MRO habrá que individualizar según el tratamiento administrado y las características específicas de cada paciente.

1.1.5.2. Tratamiento quirúrgico

En el caso de fractura, deformidad con difícil control del dolor o asociadas a fisuras óseas, artropatía pagética, neuropatías y mielopatías por atrapamiento y degeneración neoplásica estaría indicada la cirugía. En relación con las fracturas limitadas a la cortical, algunos autores recomiendan la consolidación con un clavo, para así evitar la fractura completa^{55,59, 68}.

Tabla 2. Bifosfonatos aprobados en España para la EOP.

Vía de administración	Fármaco	Dosis recomendada	Duración	% de pacientes con normalización de FA (Remisión)	Potencia relativa*	Efectos adversos
Vía oral	ETIDRONATO	400mg/día	6 meses	11-17%	1	Diarrea, náuseas, dolor abdominal
	TILUDRONATO	400 mg/día	3 meses	30-45%	X 3-10	Diarrea, náuseas, dispepsia
	RISEDRONATO	30mg/día	2 meses	65-80%	X 1.000-3.000	Dispepsia, esofagitis
Vía intravenosa	PAMIDRONATO	30mg/semana 60mg/2semanas	6 semanas 3 semanas	53%	X 100	Síndrome pseudo-gripal, hipocalcemia
	ÁCIDO ZOLEDRÓNICO	5mg	Dosis única	96%	X >10.000	

*Potencia comparada con etidronato (potencia=1)

1.1.6. Patogenia

1.1.6.1. Remodelado óseo

El hueso es un órgano de soporte, expuesto a un proceso de deterioro continuo, al igual que ocurre con las estructuras que tienen que resistir cargas mecánicas. Pero a diferencia de las estructuras de soporte inerte, el hueso es un órgano vivo, dinámico, con capacidad para renovarse permanentemente, y mantener sus condiciones de resistencia, siendo las unidades de remodelado óseo (URO), el sustrato funcional de este proceso de remodelado óseo^{77,78,79}. En este proceso intervienen un conjunto de células de diferentes estirpes formando las URO como linfocitos, macrófagos, células endoteliales, neuronas y osteocitos, siendo los osteoclastos y los osteoblastos, los principales protagonistas de este proceso de remodelado óseo, actuando de forma sucesiva y combinada (“*acoplamiento*”), acoplada tanto en espacio como en tiempo, sobre una misma superficie ósea^{79,80}. En estas URO, la reabsorción siempre precede a la formación, inicialmente los osteoclastos reabsorben una cantidad determinada de hueso y posteriormente los osteoblastos forman la matriz osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada, siendo los osteocitos los directores de orquesta de este proceso, detectando y transformando los estímulos mecánicos y hormonales en señales bioquímicas para coordinar la función tanto del osteoblasto como del osteoclasto, permitiendo así el normal funcionamiento del hueso y el mantenimiento de la masa ósea (figura 6)⁹¹. En el esqueleto, el remodelado óseo tiene lugar de forma continua, de tal manera que, en un momento determinado, hay más de un millón de URO activas, mostrando una asimetría temporal entre la intervención de los osteoclastos y la de los osteoblastos⁸³. Este recambio ocurre a la vez en distintas regiones del esqueleto, presentando diferentes grados de actividad y desarrollo en cada una de ellas⁸⁴.

El volumen de hueso renovado por cada URO es de unos 0,025 mm³, y la tasa de renovación anual del esqueleto es aproximadamente un 10% (25-30% el hueso trabecular y 3-4% el cortical)⁸³. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas

multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años.

Las funciones principales del remodelado óseo son mantener y adecuar las propiedades biomecánicas del hueso, reparar el microdaño tisular⁸², así como intervenir en diferentes procesos biológicos, como en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico, en la homeostasis del equilibrio ácido-base y en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas. Por lo que podemos considerar, que este proceso de remodelado óseo, estará influenciado por múltiples factores de transcripción y factores humorales que actuarán de forma sistémica, paracrina y local^{79,80,83}.

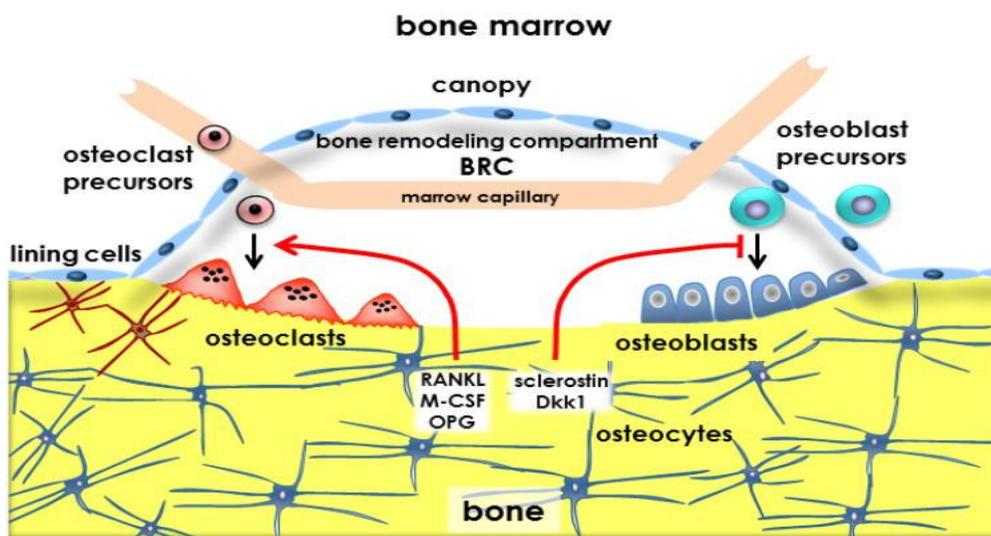


Figura 6. Unidad básica de remodelado óseo, formada por diferentes estirpes celulares como osteoclastos, osteoblastos y osteocitos, recubierto por células de revestimiento, y en contacto con los capilares sanguíneos (células endoteliales). Las citocinas pro o anti-osteoclastogénicas (RANKL, CSF-M, Osteoprotegerina (OPG), Dkk-1 (Dickkopf-1), Esclerostina), sintetizadas por las células de la unidad, para regular el remodelado óseo. [Adaptado de Bellido, 2014]⁹¹.

1.1.6.2. Fases del remodelado óseo

El ciclo completo de remodelado óseo, ampliamente coordinado en tiempo y espacio, presenta cuatro fases secuenciales: fase de activación, fase de resorción, fase intermedia de reposo y fase de formación. El tiempo necesario para que se complete un ciclo entero de remodelado óseo es de aproximadamente 6 meses (figura 7)⁸⁷.

1. Fase de activación: En esta fase los osteocitos reconocen estímulos mecánicos, hormonales y “microdaño” y liberan mediadores de membrana que activan el reclutamiento de los precursores hematopoyéticos de los osteoclastos⁸⁰. El RANKL(Ligando del receptor del activador de factor nuclear kappa β), CSF-1 o CSF-M (factor estimulante de colonias -1) y ligandos de receptores de inmunoglobulinas, producidos mayoritariamente por células de estirpe osteoblástica, aunque también puede producirse por otras células como los linfocitos T y las células del estroma, estimulan la osteoclastogénesis^{80,81}. En esta fase, el papel de CSF-1 es esencial dado que activa la síntesis de factores de transcripción necesarios para la diferenciación a osteoclasto (c-fos y PU.1)⁸⁰.

2. Fase de resorción: Es la fase de activación de la función osteoclástica. Las células estromales activadas por los osteocitos secretan CSF-1 que favorece la diferenciación de las células pluripotenciales a pre-osteoclastos que expresan en su membrana el receptor RANK (Receptor del activador de factor nuclear kappa β). La unión del ligando RANKL al receptor de membrana del osteoclasto RANK⁸¹ activa el reordenamiento del citoesqueleto de actina con la polarización de la célula hacia su borde en cepillo y su anclaje a la matriz ósea, sellando su área de contacto con la matriz, para formar la laguna de Howship^{80,81}, donde el osteoclasto libera los iones de hidrógeno y las enzimas líticas lisosomales⁸¹, responsables de la degradación del componente orgánico y mineral de la matriz ósea⁸¹. Los osteoclastos inhiben la diferenciación del osteoblasto, durante la resorción ósea a través de la expresión de Semaforina 4D que se une a su receptor (Plexina-B1) presente en los osteoblastos e inhibe la vía del IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo I), esencial para la osteoblastogénesis⁸⁷.

3. Fase intermedia de reposo o de inversión: Finalizada la fase de resorción ósea, los osteoclastos desaparecen de la laguna mediante un proceso de apoptosis. Posteriormente, la laguna de resorción es ocupada por células mononucleares de estirpe monocito/macrófago⁸⁴, que facilitan la liberación de factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente, como son TGF- β (factor de crecimiento transformante- β), PDG-F (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor de crecimiento insulínico tipo I y II) permitiendo la diferenciación, activación, y migración de precursores osteoblásticos^{80,84,85}. Los factores que regulan la

comunicación entre osteoclasto y osteoblasto son denominados factores de acoplamiento.

4. Fase de formación: Los osteoblastos rellenan el área reabsorbida con matriz ósea. En esta fase, los factores de transcripción RUNX2 (Factor de transcripción relacionado con Runt), junto con las proteínas de la vía de señalización Wnt y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), activan la diferenciación osteoblástica y la osteoformación^{79,80}. Y las células de linaje osteoblástico mediante la expresión de semaforina 3A, inhiben a los osteoclastos y por ende la suprimen la resorción ósea⁹⁸. En esta fase de formación se diferencian dos procesos, la síntesis de osteoide y, posteriormente, su mineralización. Inicialmente los osteoblastos sintetizan diversas proteínas de la matriz ósea como la osteopontina o la osteocalcina y, posteriormente, se depositan en sucesivas capas de osteoide. Finalmente, se inicia la mineralización a través del depósito de cristales de hidroxapatita. Los osteoblastos atrapados en la matriz se diferencian a osteocitos con sus largas prolongaciones dendríticas, que actuaran como sensores de futuros estímulos mecánicos. La superficie ósea quedará recubierta por multitud de osteoblastos inactivos convertidos en células de revestimiento.

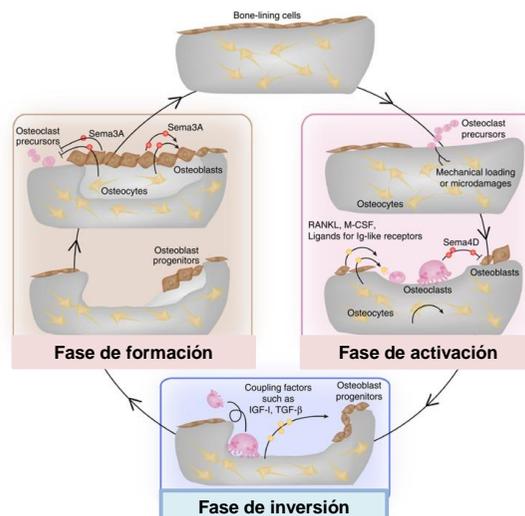


Figura 7. Etapas del remodelado óseo. Factores implicados en la comunicación entre células en las fases del remodelado óseo. [Adaptado de Negishi-Koga et al, 2012]⁸⁷

1.1.6.3. Regulación del remodelado óseo

La remodelación ósea está sometida a una regulación por múltiples factores que actúan de forma coordinada para mantener la homeostasis ósea, donde se incluyen los factores de crecimiento procedentes de la matriz ósea, los moduladores sintetizados por las células óseas (osteoclastos, osteoblastos y sobre todo osteocitos) y los factores sistémicos, como son los nutrientes y hormonas que alcanzan la unidad de remodelado óseo a través de la circulación sanguínea^{84,87,88}.

Los principales reguladores sistémicos son las hormonas calciotrópicas, donde destacan la hormona paratiroidea (PTH), el calcitriol y la calcitonina, las hormonas sexuales como los estrógenos y andrógenos, y otras como la insulina, la leptina, la hormona del crecimiento (Gh), los glucocorticoides y las hormonas tiroideas. Otros factores como el IGF-1 y las citoquinas tienen efecto a nivel local y sistémico, y existen otros factores que ejercen su principal efecto a nivel local como las prostaglandinas, el factor de crecimiento transformante TGF- β y las BMPs (figura 8).

En relación al efecto que desarrollan estos factores sistémicos en la regulación del remodelado óseo, podemos diferenciarlos en dos grupos, aquellos que promueven un efecto anabólico, facilitando la diferenciación de los osteoblastos como la Gh, la PTH intermitente, calcitonina y los estrógenos y por el contrario los que inducen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, y activan la osteoclastogénesis mediante el aumento de la expresión de CSF-1 y RANKL como los glucocorticoides. Las hormonas tiroideas como las citocinas proinflamatorias (IL-1 α y β , TNF α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-15 y IL-17) desempeñan un papel fundamental en la regulación tanto de la formación como de la resorción ósea.

El efecto de estos factores como el TGF- β , el IGF-1, las BMP, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) va a depender si son liberados de forma sistémica, facilitando la activación de la osteoclastogénesis, pero en cambio si son liberados a nivel local, desde la matriz ósea subyacente van a inhibir la acción de los osteoclastos y activar los precursores osteoblásticos, estimulando así su diferenciación y proliferación, ejerciendo un protagonismo importante en el acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos⁸⁷. Las

prostaglandinas, los leucotrienos y el óxido nítrico tienen una importante función en la respuesta de las células óseas a estímulos mecánicos e inflamatorios. Las prostaglandinas activan la proliferación del osteoclasto in vivo y son inductores de la osteoclastogénesis in vitro. Los leucotrienos activan la diferenciación del osteoclasto estimulando la resorción ósea, en cambio el óxido nítrico inhibe la función de los osteoclastos.

Otro de los factores involucrado en la regulación del remodelado óseo es el estrés mecánico, que ejerce un efecto positivo en el hueso. Parece ser que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos, estos a su vez, producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. En cambio la ausencia de presión mecánica, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez presenta un efecto deletéreo sobre el hueso, incrementando drásticamente el recambio y favoreciendo la destrucción ósea con un balance óseo negativo, y como consecuencia una disminución de la masa ósea. Por lo que la actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo óseo.

Además de los factores reguladores clásicos, se han descrito varias moléculas moduladoras de la comunicación intercelular que actúan en las distintas fases del remodelado óseo entre las que destacan las efrinas, las semaforinas, el sistema RANKL/RANK/OPG y las proteínas de la vía Wnt^{87,89}.

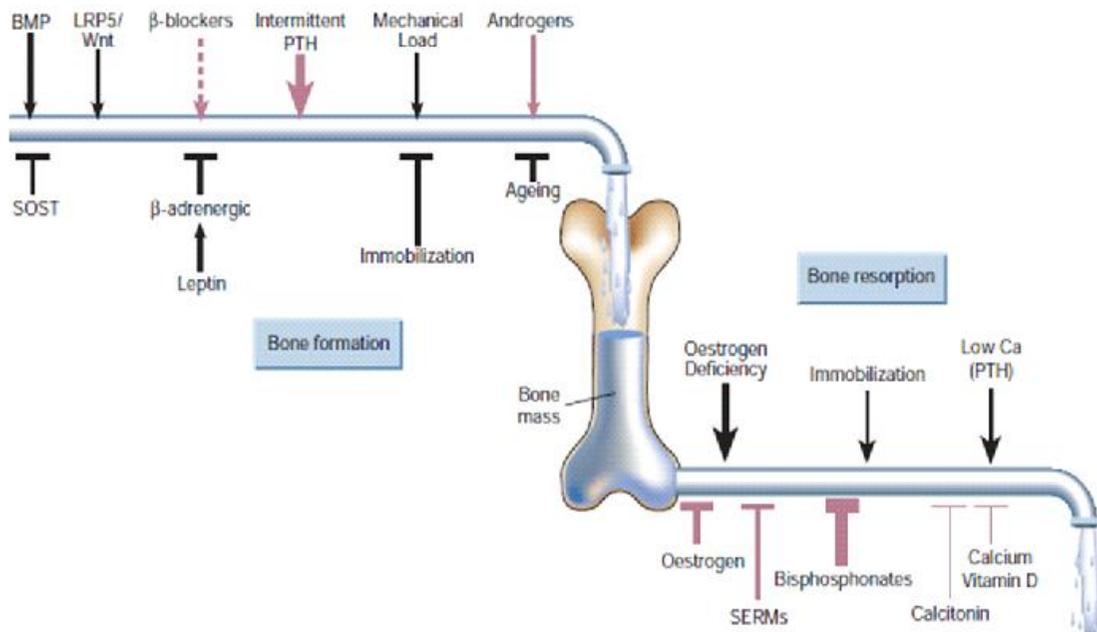


Figura 8. Homeostasis ósea. Factores que influyen en la formación y resorción ósea. Se representan en color negro los factores fisiológicos y en rosa los farmacológicos, pudiéndose comportar como estimuladores e inhibidores tanto de la formación como resorción ósea. El impacto relativo de cada factor está representado por el grosor de la línea. [Adaptado de Harada and Rodan, 2003]³²⁴.

1.1.6.4. Fisiopatología de los osteoclastos

Una de las células mayormente implicada en la unidad de remodelado óseo y con un papel protagonista en la fisiopatología de la EOP es el osteoclasto.

Los osteoclastos son las únicas células responsables de hidrolizar la matriz ósea, tanto la parte inorgánica (hidroxiapatita) mediante las enzimas proteolíticas, como la orgánica (colágeno y otras proteínas) gracias a las colagenasas y las catepsinas. Son células macrofágicas, multinucleadas (de 4 a 20 núcleos) y altamente especializadas derivadas de los precursores hematopoyéticos de estirpe monocito-macrófago (CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias Gránulo Monocíticas), que a su vez, derivan de células madre hematopoyéticas (CFU-S: Unidades Formadoras de Colonias Esplénicas) y se sitúan en la superficie ósea calcificada⁹⁴.

El RANKL y el CSF-1, son dos citocinas esenciales en el proceso de osteoclastogénesis, y por ende, en el desarrollo, función y supervivencia del osteoclasto. La presencia de ambos factores es necesaria para la maduración del preosteoclasto y mediante la expresión de determinados genes como TRAP (fosfatasa ácida resistente al tartrato),

CATK (catepsina K), CTR (receptores de calcitonina) y β 3 integrina, van a caracterizar su estado de madurez^{80,81} (figura 9A).

La activación del osteoclasto se desarrolla en respuesta a la unión entre el receptor RANK presente en su membrana y su ligando (RANKL). Esta unión da lugar al inicio de la cascada intracelular que ocasionara la polarización de la célula, induciendo una alteración en su citoesqueleto de actina y la formación de “uniones estrechas” (“*tight junction*”) que rodean la zona entre la superficie del hueso y la membrana basal, la cual se pliega múltiples veces para formar el borde rugoso del osteoclastos⁹². A este compartimento sellado que se establece entre el osteoclasto y el hueso se le denomina laguna de resorción o de *Howship*⁸¹. Esta zona de la membrana contiene un alto número de vacuolas cargadas de ATPasas, bombas de protones y lisosomas que contienen enzimas proteolíticas ácidas, como la anhidrasa carbónica II (CAII) que facilitará la disolución de la hidroxiapatita. Tras la disolución de la fase mineral, el osteoclasto activado, se inicia el proceso de resorción de la matriz ósea orgánica (figura 9B). En esta laguna la célula segrega protones, que conducen a la activación de TRAP, metaloproteinasas de matriz -9 (MMP-9) y la CAT K, que son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz ósea orgánica y del colágeno (figura 9C)⁸¹. Los restos degradados de la matriz ósea, entre los que destacan los fragmentos del colágeno y proteínas no colágenas, el fosfato y el calcio solubilizado son incorporados por endocitosis por los osteoclastos y transportados al borde opuesto de la célula, región denominada *dominio secretorio funcional*, donde son liberados a la circulación⁹³. Este proceso de transcitosis permite al osteoclasto permanecer en movimiento mientras continúa degradando matriz ósea sin necesidad de eliminar la región de aislamiento que está permanentemente reorganizándose⁹⁵.

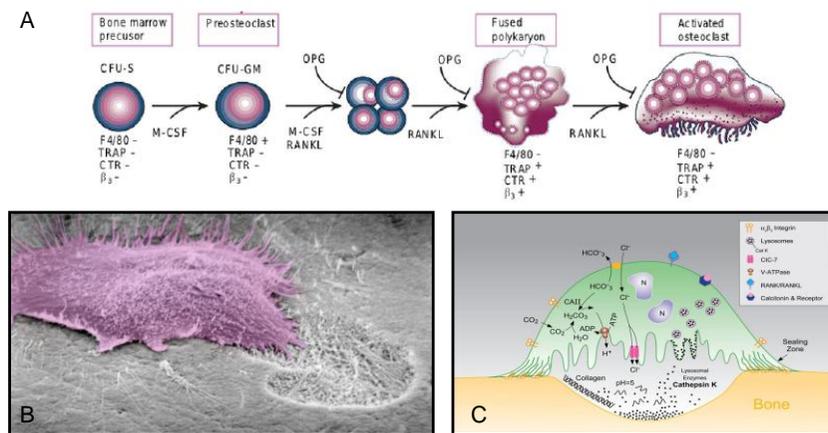


Figura 9. Reguladores de la diferenciación del osteoclasto a partir de precursores hematopoyéticos. [Adaptado de Boyle et al., 2003]⁸¹. **B** El osteoclasto activo en la resorción. Resorción osteoclástica. Imagen de microscopia electrónica [Adaptado de: http://www.brsoc.org.uk/gallery/arnett_osteoclast.jpg, reproducida con el permiso de © Tim Arnett, The Bone Research Society]. **C**. Representación esquemática de un osteoclasto activo polarizado [Adaptado de Baron R., 2003]¹⁰⁹

1.1.6.4.1. Vías de señalización celular. Sistema RANKL/RANK/OPG

El sistema RANKL/RANK/OPG constituye una cadena fisiológica en la determinación del balance del remodelado óseo, siendo un sistema de comunicación intercelular que regula especialmente la osteoclastogénesis: tanto en la diferenciación como en la activación de los osteoclastos (figura 10)^{89,96}. El RANKL es una proteína transmembrana tipo II, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, que ocasionalmente también puede estar presente en forma soluble, sintetizado principalmente por células de estirpe osteoblástica como los osteoblastos y los osteocitos y que al unirse a su receptor específico, al receptor de membrana RANK, localizado en la superficie de los precursores osteoclásticos, inicia una cascada intracelular con el reclutamiento de TRAF6 (factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), que provoca la activación y liberación del NF-κβ (factor nuclear kappa β) y permite su translocación al núcleo, aumentando la expresión del factor de transcripción c-fos/Fra-1, activándose la transcripción de genes implicados en la osteoclastogénesis^{81,96}. Esta unión RANK/RANKL activa la diferenciación, maduración y supervivencia del osteoclasto. En consecuencia se produce un efecto favorecedor de la resorción ósea gracias a un aumento de la actividad osteoclástica. Además de la estimulación del precursor del osteoclasto mediante la fracción de RANKL soluble en la

fase inicial de la osteoclastogénesis existe una interacción con RANKL unido a membrana, de forma que es necesario un contacto intercelular entre el osteoblasto y el precursor del osteoclasto. La activación de esta vía es dosis-dependiente de RANKL⁸¹. Además, el RANKL, junto con el CSF-1, también resulta esencial para la supervivencia del osteoclasto. En cambio, la OPG, otro miembro de la familia del TNF, es un receptor proteico soluble sintetizado por las células de estirpe osteoblástica, como los osteoblastos y los osteocitos, que actúa como receptor señuelo, e interviene en la contraregulación del sistema RANK/RANKL⁸⁷. Así, la unión de OPG con RANKL impide la unión de RANK con RANKL, inhibiendo los efectos de RANK, y por ende, la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos. De este modo la OPG bloquea la resorción ósea, mediante la supresión de la proliferación, activación y diferenciación de los osteoclastos e induce su apoptosis inhibiendo así la osteoclastogénesis, por lo que es considerada como uno de los principales mecanismos reguladores de esta vía de señalización^{81,89}.

La relación entre los niveles de OPG y RANKL y la unión de este último a su receptor RANK es clave en la regulación de la actividad de los osteoclastos, y por ende en la determinación del estado anabólico o catabólico del hueso. Una alteración en dicho sistema de señalización RANKL/RANK/OPG provocaría una desregulación del remodelado óseo y como consecuencia estados patológicos que afectan principalmente al metabolismo óseo como en la EOP u osteoporosis entre otras.

A pesar de su clara implicación en la homeostasis del hueso, este sistema de señalización también ha sido vinculado con la osteoimmunología, patología vascular y oncológica mamaria, probablemente debido a que la expresión de OPG y RANKL⁸⁹ no proviene en su totalidad de las células de estirpe osteoblástica, dado que también se expresan en las células del estroma, las células T activadas, las células B, los fibroblastos, las células endoteliales, los condrocitos y las células epiteliales mamarias^{89,96}. Existen numerosos factores que influyen en la expresión y en el balance de este equilibrio en el sistema RANKL/OPG como son los factores de crecimiento, hormonas, citocinas y fármacos⁹⁶.

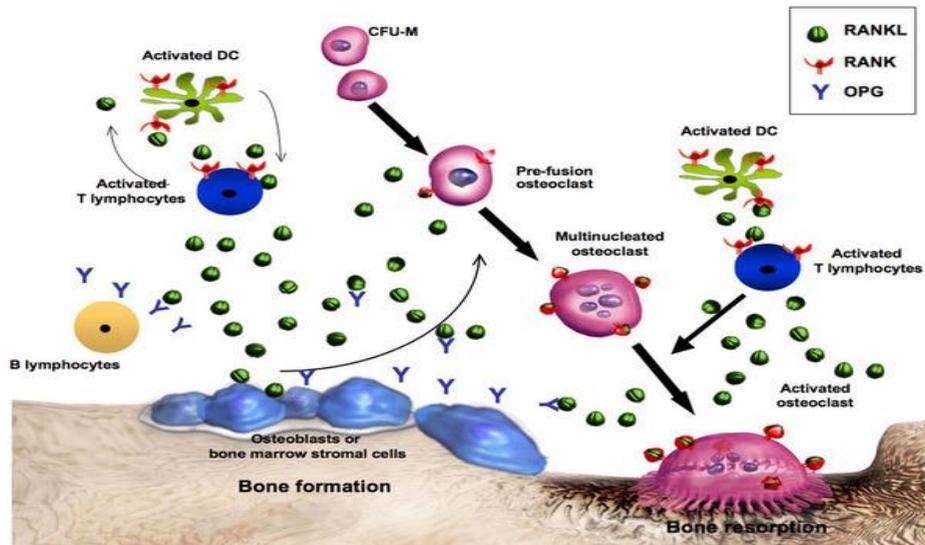


Figura 10. Sistema RANKL/RANK/OPG en la regulación de la osteoclastogénesis inducida por los osteoblastos, a través de la síntesis de OPG, que tras unirse a RANKL, impide la unión de éste al receptor de la membrana de los osteoclastos RANK, e inhibe la diferenciación osteoclástica. [Adaptado de Ferrari-Lacraz et al,2009]⁹⁷

1.1.6.5. Patogenia en la enfermedad ósea de Paget

La EOP se caracteriza por ser un trastorno crónico y focal o multifocal del remodelado óseo. A pesar que se han descrito anomalías en todas las fases del proceso de remodelado óseo, la lesión primaria radica en la regulación de los osteoclastos, mostrando una función de resorción osteoclástica focal muy aumentada secundaria a un incremento en su número, tamaño y actividad resorptiva, con un fenotipo hipernucleado característico (más de 50 núcleos por célula)¹⁰⁰.

En respuesta a la resorción ósea excesiva, la formación ósea se acelera enormemente, los estudios histomorfométricos con marcaje con tetraciclina sugieren que es de 6-7 veces mayor de lo normal⁹⁹. La formación osteoblástica rápida y compensadora, es de igual intensidad aunque desorganizada, despolarizada y caótica, dando lugar a un patrón histológico en mosaico, de hueso laminar propio del hueso maduro, y plexiforme, característico del inmaduro, con fibrosis paratrabecular y aumento de la vascularización, sin mostrar anomalías en la mineralización de la matriz ósea. Esta tasa acelerada de recambio óseo va a dar lugar una estructura ósea inmadura, desorganizada, no laminar y muy vascularizada, que va a condicionar variaciones del tamaño, densidad y consistencia de los huesos afectados, ocasionando alteraciones biomecánicas del mismo,

lo que facilita la aparición de un hueso con menor resistencia, más frágil y más susceptible a deformidades y fracturas¹⁰¹.

En base a la evidencia acumulada tanto in vitro como in vivo, el recambio óseo acelerado focal de la EOP es causado por anomalías preferentemente, en las vías de señalización que regulan la diferenciación, proliferación y función osteoclástica, dependiente principalmente de las interacciones entre tres moléculas como son RANK, codificado por el gen del receptor de la superfamilia del TNF-11A (TNFRSF11A), RANKL, codificado por el gen TNFSF11, y osteoprotegerina (OPG), codificada por el gen TNFRSF11B^{2,70,119}.

El osteoclasto es la célula principalmente afectada en la EOP. Los osteoclastos procedentes de las lesiones pagéticas se encuentran aumentados en número y tamaño, y presentan un fenotipo hipernucleado característico, contienen más de 50 núcleos, en contraste con osteoclastos normales, que contienen entre 3 a 20 núcleos¹¹³. Una característica diferencial de los osteoclastos pagéticos son las inclusiones nucleares, que consisten en matrices paracristalinas que son similares a nucleocápsides de paramixovirus (figura 11)¹¹⁴. Estas inclusiones nucleares no se han objetivado en otras células de la médula ósea de la lesión pagética ni en hueso no pagético de pacientes afectados de EOP. A pesar de la existencia de inclusiones nucleares similares en diferentes patologías como la oxalosis, la osteopetrosis y los tumores óseos de células gigantes¹¹⁵⁻¹¹⁷, este hallazgo no es constante en estas patologías, como lo es en la EOP. La naturaleza de estas inclusiones intracelulares sigue siendo controvertida, ya que algunos grupos no han encontrado ninguna conexión entre las inclusiones intracelulares y las nucleocápsides del sarampión¹²⁰. Últimamente, se ha sugerido que podrían ser agregados de proteínas resultantes de la desregulación del sistema de autofagia o del sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS), siendo estas las rutas más relevantes de la degradación proteica intracelular¹⁰⁴.

A pesar de las alteraciones morfológicas evidenciadas en los osteoclastos pagéticos, también se han descrito anomalías fisiológicas en los precursores de los osteoclastos (figura 11). En estudios in vitro de médula ósea de paciente afectados de EOP, se han identificado varias diferencias entre los osteoclastos de lesiones pagética y los osteoclastos de huesos sanos. Los osteoclastos con fenotipo pagético se caracterizan por presentar un fenotipo anormal con una hipersensibilidad a diferentes factores osteoclastogénicos como RANKL, TNF α y la 1,25-dihidroxitamina D. Este hecho se ha

constatado en los cultivos obtenidos de lesiones pagéticas, donde se observa la diferenciación de los osteoclastos multinucleados pagéticos a concentraciones de estos factores osteoclastogénicos de 10 a 100 veces inferiores a los niveles óptimos para la diferenciación normal del osteoclastos^{102,105,106}. Asimismo, los niveles de TAF_{II}-17, un componente del complejo de transcripción TAF_{II}D que se une al receptor de la vitamina D, se encuentra aumentado en los precursores de osteoclastos pagéticos, pudiendo ser el responsable de la hipersensibilidad a 1,25-dihidroxitamina D^{107,112}. Otras anomalías también se han observado en los osteoclastos, en los precursores de osteoclastos y en las células del estroma de la médula ósea de pacientes afectados de EOP, en ellos se expresan niveles elevados de factores de resorción ósea, como IL-6, interferón- γ y RANKL, que contribuyen a la regulación positiva de osteoclastogénesis e impulsan la formación de un hueso aberrante^{108, 112}, pudiendo considerarse también epifenómenos de un elevado “*turnover*” óseo¹⁰⁸.

A pesar que la EOP se define como una enfermedad fundamentalmente de osteoclastos, se han observado la existencia de un mayor número de osteoblastos en las lesiones óseas, sin embargo, aunque con una morfología aparentemente normal, presentan un incremento en la expresión génica de diferentes citocinas osteoclastogénicas como RANKL, IL-1 β , IL-6, Dickkopf-1 (inhibidor de la vía de señalización Wnt), contribuyendo de forma sinérgica en la estimulación local de la osteoclastogénesis, característico de esta enfermedad, sin poder llegar a considerarlos como un factor fisiopatológicamente clave en la EOP^{102,103}.

Durante el curso de la enfermedad, la lesión pagética puede evolucionar a diferentes fases, pudiendo coincidir en un mismo individuo distintas lesiones con diferentes estadios evolutivos. La fase inicial de la EOP, denominada *fase osteolítica*, se caracteriza por una resorción ósea excesiva con una actividad metabólica elevada, en una región focal determinada, mostrando en el examen radiológico una lesión lítica. Posteriormente, la formación ósea también se encuentra notablemente aumentada, con un incremento en el número de osteoblastos que parecen hiperactivos pero morfológicamente normales, condicionando un depósito rápido, caótico y desorganizado de hueso inmaduro con una disposición no laminar, lo que explica las deformidades e incluso fracturas. En esta siguiente fase denominada *fase mixta*, existe un equilibrio entre la resorción osteoclástica y la formación osteoblástica, y por último, en la etapa más avanzada de la EOP predomina una osteoformación osteoblástica

principalmente, que se define como *fase esclerosa*, con reemplazo de la médula ósea por tejido vascular y fibroso y engrosamiento óseo ^{118,57}.

Este aumento de remodelado óseo existente en la EOP, se refleja también en los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, con presencia de niveles elevados tanto en los marcadores de formación ósea así como en los de resorción, objetivándose una alta correlación entre ambos, reflejo de la existencia de acoplamiento entre la resorción y la formación ósea¹¹⁸. Por consiguiente, podemos considerar a la EOP como el ejemplo más exagerado de "acoplamiento" entre osteoclastos-osteoblastos con un aumento notable tanto en la resorción como en la formación ósea. Por lo tanto, esta entidad nos va a proporcionar un paradigma clave para entender los mecanismos moleculares que regulan tanto la formación aberrante del osteoclasto como la actividad de los osteoblastos inducida por el osteoclasto.

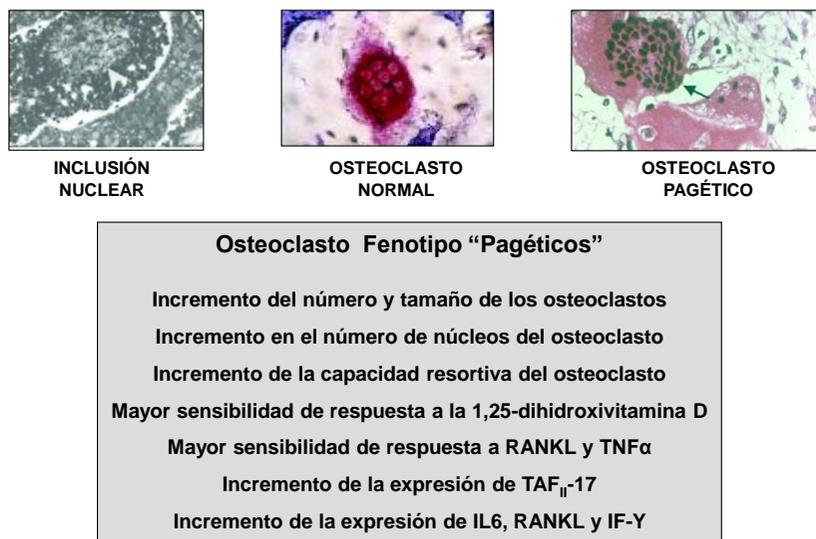


Figura 11. Características del osteoclasto con fenotipo “Pagético” [Adaptado de Deborah L. et al. 2014] ¹¹²

1.1.7. Etiología

Desde hace años el estudio de los factores implicados en la etiología de la EOP, ha constituido un área de investigación muy activa, se han propuesto múltiples hipótesis, pero a día de hoy este enigma permanece sin descifrar.

El descenso de la prevalencia y de la severidad de la enfermedad en las últimas décadas, junto con su naturaleza focal y una penetrancia incompleta, combinado con la

existencia de diferentes mutaciones en el gen *SQSTM1* identificadas fundamentalmente en la EOP, denotan la presencia de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales como base etiológica de esta enfermedad.

Actualmente, es considerada una enfermedad compleja, multifactorial con participación sinérgica entre factores ambientales y genéticos, siendo este, el modelo integrado, el más aceptado y plausible, dado que ni los factores ambientales ni los genéticos explicarían por separado la etiopatogenia de la EOP. Por lo tanto, en una edad temprana, los precursores osteoclasticos podrían ser sensibilizados por un factor ambiental aún no conocido y el condicionamiento genético explicaría la susceptibilidad individual para finalmente desarrollar o no la enfermedad años después^{121,122}. Este factor de susceptibilidad genética explicaría ciertos rasgos epidemiológicos como la predisposición a desarrollarse en determinados grupos étnicos y la fuerte tendencia a la agregación familiar.

1.1.7.1. Factores ambientales

La predisposición genética juega un papel crucial en el desarrollo de la EOP, sin embargo, algunos estudios han demostrado que los niños cuyos padres son portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1* no siempre desarrollan la enfermedad, o presentan un gran retraso en la aparición de los síntomas, siendo estos menos severos. Probablemente, la existencia de una penetrancia incompleta o la presencia de un fenotipo más leve en los descendientes, pueda ser el reflejo de una exposición reducida a uno o más factores patógenos ambientales¹²³⁻¹²⁵. De la misma manera, en estudio de animales, los ratones que expresaban la mutación *SQSTM1* p.P392L mostraron un mayor número de osteoclastos y una pérdida progresiva de masa ósea, pero no se observaron cambios en osteoblastos, por lo tanto no desarrollaron lesiones óseas pagéticas¹²⁶. Estos hallazgos, junto con los datos epidemiológicos observados, como su distribución heterogénea, o la disminución en la prevalencia en los últimos años e incluso el descenso secular en la gravedad en el momento del diagnóstico, apoyarían la participación de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.

Son varios los factores ambientales que se han postulado como posibles factores etiológicos en la EOP: dietas pobres en calcio y déficit de vitamina D en la infancia, contacto con perros durante la infancia o juventud¹²⁷, consumo de carne de vacuno no controlada en la infancia¹²⁸ o consumo de aguas no purificadas²⁵, excesiva carga

mecánica sobre el esqueleto y diversos tóxicos ambientales¹²⁹. Sin embargo los factores ambientales implicados con mayor frecuencia han sido los agentes infecciosos, principalmente los virus de la familia Paramyxoviridae (virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus del moquillo canino y los virus de la parainfluenza). La hipótesis de una infección vírica persistente surgió al observar en los osteoclastos inclusiones intracelulares similares a las nucleocápsides de los *paramyxovirus*^{131,132}. Sin embargo, a lo largo de los años, la validez de esta teoría ha sido puesta en duda por múltiples equipos de investigadores, al no confirmarse los resultados e incluso no conseguir detectar ninguna secuencia vírica¹²⁰, reforzándose la hipótesis que postula que estas formaciones intracelulares realmente corresponden a agregados proteicos similares a los que se observan en las enfermedades neurodegenerativas¹³⁵, como consecuencia de alteraciones en el proceso de autofagia¹³⁴. Sin embargo, estudio recientes han demostrado la implicación de las proteínas virales de los *paramyxovirus* en la regulación positiva de la IL6 e IGF-1 y en la diferenciación del osteoclasto con fenotipo pagético tanto en modelos animales como en pacientes afectados de EOP, lo que podría sugerir un papel en el remodelado óseo característico de estos pacientes^{136,137}. En relación a las observaciones acerca de las alteraciones en la regulación del proceso de autofagia implicadas en el desarrollo de la EOP, se han descrito en estos pacientes, diversas mutaciones en diferentes genes como *SQSMT1*, *VCP* y *OPTN* que codifican proteínas implicadas en este proceso^{2,124}. También se ha observado en los modelos animales portadores de mutaciones en el gen *SQSMT1*, una mayor expresión de genes relacionados con la autofagia, como *SQSMT1*, *ATG5* y *LC3*¹⁴⁰. Asimismo, en pacientes con EOP independientemente de presentar o no mutaciones en el gen *SQSTM1* se han detectado niveles más elevados de la proteína p62^{141,142}. Por consiguiente, es relevante resaltar la importancia de los factores ambientales descritos y su asociación sinergia con la heterogeneidad genética evidenciada en estos pacientes como base en la etiopatogenia de esta enfermedad.

1.1.7.2. Susceptibilidad genética. Heterogeneidad genética

Desde que en 1883 se publicara el primer caso familiar de EOP, múltiples estudios han sugerido la presencia de un sustrato genético en la etiopatogenia de la enfermedad¹⁴³

El factor de susceptibilidad genética explicaría ciertos rasgos epidemiológicos como la predisposición a desarrollarse en determinados grupos étnicos y la fuerte tendencia a la

agregación familiar. Aproximadamente, entre el 15 y el 40% de los pacientes tienen una historia familiar positiva^{145,37,39}. El riesgo relativo de desarrollar la enfermedad ha sido estimado en 7 veces superior entre los familiares de primer grado de pacientes con la enfermedad respecto a la población general¹⁴⁷. El patrón de herencia es autosómico dominante con una penetrancia incompleta que aumenta con la edad, observándose una alta penetrancia alrededor del 80% a partir de la séptima década^{145,148,149}. Dado que el mecanismo es multifactorial, no puede justificarse por una sola variante genética. La existencia de varias familias con varios miembros afectados con un patrón hereditario consistente con una transmisión autosómica dominante ha permitido la realización de análisis de ligamiento y estudio de gen candidato, donde se identificaron, 7 loci asociados a la susceptibilidad a desarrollar EOP clásica: 6p21.3 (PDB1 locus)^{150,151}, 18q21-22 (PDB2)¹⁵²⁻¹⁵⁵, 5q35 (PDB3)^{148,149,157}, 5q31 (PDB4)¹⁴⁹, 2q36 (PDB5)¹⁴⁸, 10p13 (PDB6)¹⁴⁸ y 18q23 (PDB7)¹⁵⁶. Estas mutaciones se describen como PDB (Paget's Bone Disease) seguidos de un número, por el momento del 1 al 7, que corresponde al orden cronológico de su descripción. Desde entonces se ha desarrollado una dinámica actividad investigadora que ha llevado a identificar varios loci candidatos.

El gen que ha mostrado mayor asociación es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*)¹⁵⁸, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), codifica la proteína p62 ó proteína del sequestosoma1, que juega un papel importante en la cascada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis a través de la vía NF-κB¹²³. Se ha observado que variaciones en la proteína p62 causarían un desacoplamiento en la activación de la vía NF-κB, traduciéndose en un gran incremento de la osteoclastogénesis, base patogénica del desarrollo de la EOP. También, se ha demostrado que mutaciones en esta proteína, como la mutación p.P392L, facilita el desarrollo de la EOP en modelos murinos, al alterar el proceso de autofagia en los osteoclastos, ocasionando un gran incremento de la osteoclastogénesis, ratificando la base etiopatogénica de la EOP¹⁷⁹.

En base a la literatura, se ha detallado que ser portador de mutaciones en el gen *SQSTM1* solo explicaría del 20 al 40% de los pacientes con antecedentes familiares y entre el 5-10% de los pacientes con enfermedad esporádica^{123,160}. En los últimos años, gracias a las tecnologías emergentes de secuenciación de alto rendimiento como los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (Genome-wide association study)^{161,162} y a estudios de asociación de gen candidato se han podido identificar

diferentes loci de susceptibilidad, así como genes candidatos. En el primer GWAs¹⁶² realizado con 1250 pacientes afectados de EOP con SQSTM1 negativo y 1537 controles, se describieron 6 variantes polimórficas o SNPs asociados a la enfermedad, observando un riesgo a desarrollar la enfermedad de alrededor un 70% en los pacientes portadores de dichos alelos, identificándose los siguientes genes como genes de susceptibilidad: 1. El gen de factor estimulante de colonias 1 (*CSF-1*) localizado en el cromosoma 1p13, que codifica el factor estimulante de las colonias de macrófagos (CSF-M), involucrado en la formación y supervivencia del osteoclasto^{163,164}. Una variante “*missense*” (p.L408P) en el gen CSF1 se ha detectado en un paciente con Paget óseo juvenil¹⁶⁵. 2. El gen *TNSRSF11A* localizado en el cromosoma 18q21.33, que codifica el receptor activador del factor nuclear Kappa β (RANK), corresponde al locus PDB7, identificado en estudios previos en diferentes familias mediante estudios de ligamiento genético¹⁵⁶. Los dos SNPs (rs2957128 y rs3018362) asociados se encuentran en una región intergénica próxima al gen *TNSRSF11A*. La proteína RANK es clave en la diferenciación y función del osteoclasto mediante la activación de la vía de señalización de RANK- NF- κ B. En un reciente estudio de asociación, se identificaron dos variantes genéticas (rs1805034 (c.T575C, p.V192A en el exón 6) y rs35211496 (c.C421T, p.H141Y, en el exón 4) asociados a EOP, observándose un incremento en la severidad del fenotipo, cuando estos polimorfismos se cosegregaban con la mutación p.P392L del gen *SQSTM1*¹⁶⁶. 3. el gen *OPTN* que codifica la optineurina (OPTN) se localiza en el cromosoma 10p13, y el SNP rs1561570 asociado, se ha identificado en la región intrónica de este gen, incrementando un 67% el riesgo a desarrollar la EOP, mediante la reducción de la expresión del gen *OPTN* en los portadores del alelo T¹⁶⁸. Aparte de la importancia de este gen en el glaucoma¹⁶⁷, se ha relacionado con el proceso de autofagia¹⁶⁹, así como en la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B dependiente de CYLD, actuando como regulador negativo en la diferenciación del osteoclasto¹⁷⁰. A su vez, OPTN también favorece esta inhibición de la diferenciación del osteoclasto debido a su implicación en la vía de señalización INF- β .

Un año más tarde, se llevó a cabo un nuevo GWAS¹⁶¹ incluyendo un número mayor de pacientes, con un total de 2223 casos de EOP SQSTM1 negativo y 4601 controles, donde se confirman los hallazgos previos y se identifican 4 nuevas variantes asociadas a la EOP: 1. En el gen *NUP205*, localizado en el cromosoma 7q33, que codifica la proteína nucleoporina 205 kDa, se identificó la variante alélica rs 4294134 en la región

intrónica, mostrando una fuerte asociación con la EOP. Esta proteína nucleoporin 205KDa, se encuentra involucrada en la regulación del transporte selectivo y bidireccional nuclear siendo un componente del complejo de poro nuclear¹⁷¹. 2. el gen *TM7SF4* localizado en el cromosoma 8q22.3 codifica la proteína transmembrana específica de la célula dendrítica (DC-STAMP) involucrada en la multinucleación y en la formación de los osteoclastos¹⁷². Estas variantes genéticas rs2458413 (intrón) y C1189T (p.L397F)¹⁶¹ incrementan la expresión de DC-STAMP durante la osteoclastogénesis, favoreciendo el aumento del número de núcleos en la célula multinucleada, es decir, el fenotipo de osteoclastos multinucleados pagéticos¹⁷³. 3. el gen *RIN 3*, localizado en el cromosoma 14q32.12, que codifica las proteínas Rab y Ras, son pequeñas GTPasas involucradas en el tráfico vesicular, importantes para la función del osteoclasto¹⁷⁴. Este gen se ha relacionado con una patología con características similares a la EOP, este síndrome se conoce como IBMPFD (Miopatía por cuerpos de inclusión, enfermedad ósea de Paget y demencia frontotemporal) y se caracteriza por presentar una miopatía por cuerpos de inclusión asociada a la enfermedad ósea de Paget de inicio precoz y demencia frontotemporal. Este síndrome también se ha asociado a mutaciones en el gen *VCP* (valosin containing protein)²⁷⁶ 4. el gen *PML* (gen de la leucemia promielocítica), localizado en el cromosoma 15q 24.1, involucrado en la vía de señalización TGF- β , y por ende en la regulación del remodelado óseo. La variante “*missense*” (p.Phe645Leu) del gen *PML* identificada en el estudio, ha mostrado una fuerte asociación con la EOP^{161,176}. El gen *GOLGA6A*, también ha sido localizado en el mismo loci de susceptibilidad y codifica la proteína Golgin A6A, localizada en el aparato de Golgi, e involucrada en patologías como la osteoporosis severa y la displasia ósea letal¹⁷⁷. Recientemente, se han identificado distintos genes implicados en el proceso de autofagia como candidatos que incrementan la susceptibilidad a desarrollar EOP: *ATG16L1*, *ATG5*¹⁷⁸. Mientras que la presencia de un polimorfismo (C635T, p.T212M) en el gen *ATG10* se ha asociado a una disminución de riesgo de presentar EOP.

1.2. GEN DEL SEQUESTOSOMA1 (*SQSTM1*). ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET

1.2.1. Gen *SQSTM1* y proteína p62

En la actualidad, el modelo más plausible que describe la etiopatogenia de la EOP es la participación sinérgica entre factores ambientales y genéticos. El gen que ha mostrado

mayor susceptibilidad es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*)¹⁵⁸, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), su transcrito tiene un tamaño de 16kb distribuidos en 8 exones y codifica una proteína de 62kDa, denominada p62 ó proteína del sequestosoma1 (figura 12)^{180,181}.

La p62 es una proteína multidominio, multifuncional, intracelular, adaptadora con una distribución ubicua, mostrando un papel fundamental en gran variedad de funciones celulares mediante la participación en diferentes rutas de señalización, siendo la más importante, la relacionada con las señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis, ya que interviene en la transducción de señales de la vía NF- κ B, que es clave en la diferenciación, función y supervivencia de los osteoclastos^{180,181}.

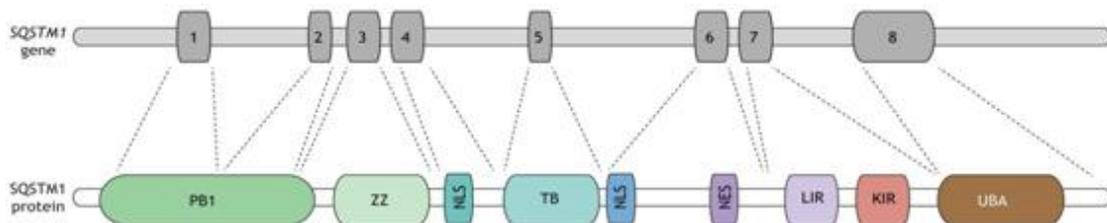


Figura 12. Estructura genética del gen *SQSTM1*. La equivalencia entre los exones del *SQSTM1* y los dominios de la proteína p62 se indica mediante líneas discontinuas. [Adaptado de Sánchez-Martin P. & Komatsu M., 2018]¹⁸⁶

La p62, consta de 434 aminoácidos, distribuidos en diferentes dominios estructurales que interaccionan con proteínas vinculadas en distintas rutas de señalización, siendo necesarias para la realización de una gran variedad de funciones celulares, como su intervención en procesos como la supervivencia, activación y diferenciación del osteoclasto mediada por la vía de señalización RANK-TRAF6-NF- κ B, en la apoptosis mediada por caspasas, en la degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS), así como andamio en la formación del autofagosoma en el proceso de autofagia y en la regulación del estrés oxidativo inducido por la ruta Keap1/Nrf2 (figura 13)^{182,183}.

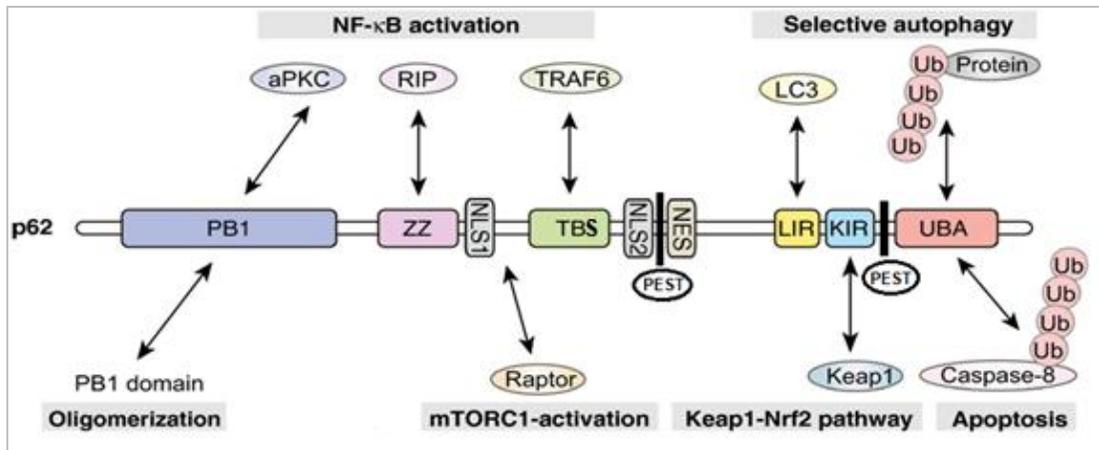


Figura 13. Dominios estructurales de la proteína adaptadora multifuncional p62/SQSTM1, necesarios para su interacción con la maquinaria autofágica y con las vías de señalización implicadas en la respuesta antioxidante, apoptosis, degradación proteica mediada por sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y en la regulación de la vía de señalización RANK-TRAF6-NFκB clave en la osteoclastogénesis. NES, señal de exportación nuclear; NLS, señal de localización nuclear. [Adaptado de Katsuragi Y, 2015]²³⁵.

La proteína p62 tiene diferentes dominios estructurales entre los que se encuentran: El dominio N-terminal PB1 (Phox and Bem1) compuesto por 82 aminoácidos (aa. 21-103), es responsable de la homodimerización de p62 o la heterodimerización con la proteína homóloga de p62, y además puede promover la interacción con el receptor para la autofagia BRCA1 (NBR1), pudiendo restringir la autofagia mediante la activación de mTOR. Como p62 es un sustrato funcional de la autofagia, los defectos en la misma causan su acumulación perturbando otras vías. A través de su dominio PB1, p62 puede unirse a diferentes quinasas: PKC atípica (aPKC), ERK1, MAP2K5, MAP3K3 pudiendo influir en el factor de transcripción NF-κB, relacionado con la osteoclastogénesis. A continuación, el dominio ZZ (región con dedos de Zinc) compuesto por 35 aminoácidos (aa. 128-163) y el dominio TBS (TRAF6-binding domain) de 26 aminoácidos (aa. 225-250) que interactúan con RIP1 y TRAF6, respectivamente, para promover la activación de NF-κB a través de la formación de complejos. Entre estos dos dominios se encuentra la región que interactúa con la proteína Raptor, que participa en la activación de la quinasa metabólica mTOR., siendo un sensor frente a la detección de nutrientes. A través del dominio LIR interacciona con el C-terminal LC3B (LIR, aa. 321-345), implicada en la formación del autofagosoma, en el proceso de autofagia. El dominio KIR compuesto por 13 aminoácidos (aa. 346-359) interactúa con Keap1, para inducir la translocación nuclear del factor de transcripción NRF2 y promover la expresión de

genes citoprotectores, participando en la respuesta antioxidante. La proteína p62 se une a la poliubiquitina a través de su dominio UBA carboxiterminal (aa.386-440), facilitando la degradación selectiva de proteínas ubiquitinadas a través de la vía del proteosoma. También se encuentran el dominio p38BS (173-182aa) que se une a la p38 lo que facilita la activación de la quinasa p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y el dominio LB (170-220), región de unión de proteínas que contiene Lim (Lin11, Isl-1 y Mec-3). Y dos dominios PEST (P1 (266-294aa) y P2 (345-377) contienen 28 y 32 aminoácidos respectivamente, ricos en aminoácidos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), son regiones hidrofóbicas que facilitan la rápida degradación proteica. La proteína p62 también contiene dos secuencias NLS y una secuencia NES que permiten que p62 entre y salga del núcleo. En virtud de todas estas interacciones, p62 tiene un papel fundamental en el cáncer, diferenciación celular, la inflamación, el metabolismo y el crecimiento celular^{182,183}.

1.2.2. Funciones de la proteína p62

La proteína p62, es una proteína adaptadora multidominio intracelular, que le permite realizar reconocimientos, acoplamientos o interacciones proteína-proteína de forma simultánea, lo que pone de manifiesto su papel como proteína reguladora de complejos multiprotéicos en respuesta a diversos estímulos más que como una mera molécula de ensamblaje. La p62 tiene un papel fundamental en gran variedad de funciones celulares, interviniendo en procesos complejos de señalización celular como la supervivencia celular, apoptosis, marcaje de proteínas y degradación proteica a través del sistema ubiquitina- proteosoma y formación del autofagosoma en la autofagia, así como en la regulación de procesos de estrés oxidativo mediante las vías de señalización Keap1/Nrf2^{180,182,185}. A pesar de los diferentes procesos celulares donde se encuentra involucrada, la mayor parte de la atención se ha centrado en aquellos que afectan a la diferenciación, actividad y supervivencia de los osteoclastos en relación a su papel en la regulación de la vía de señalización RANK-TRAF6-NFκB¹⁸⁴.

1.2.2.1. Supervivencia celular mediada por la vía de señalización RANK-TRAF6-NFκB

La p62 es fundamental, ya que es la proteína en la que convergen múltiples señales celulares que activan la osteoclastogénesis a través de la ruta RANK-TRAF6-NF-κB. El

papel mejor caracterizado de p62 es la regulación de la vía de señalización RANK-TRAF6-NF- κ B en los osteoclastos, que conducen a la activación de los diferentes factores de transcripción como el NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), AP-1 (“proteína activadora 1”) y NFAT (“factor nuclear de células T activadas”), proceso fundamental en la diferenciación, maduración y supervivencia de los osteoclastos y, por lo tanto, en la resorción ósea (figura 14)¹⁸⁴.

El RANKL secretado por los osteoblastos y células estromales, se unirá a su receptor RANK, localizado en los precursores osteoclasticos¹⁸⁸. Esta unión favorece que TRAF6 se una a RANK, lo que promueve que p62, a través de su dominio TBS se una a TRAF6, unión que favorece la dimerización de p62 a través de su dominio PB1. La dimerización de p62 se lleva a cabo gracias a la autoubiquitinación de TRAF6 con residuos de Lys-63 mediante uniones covalentes, mediado por su actividad E3 ligasa¹⁸⁹. Tras la unión de p62 a TRAF6 favorece la adición de más residuos de Lys-63 a TRAF6 y la unión de la quinasa aPKC a su dominio PB1, formando un complejo terciario. Para favorecer la liberación del factor NF- κ B y por ende su traslocación al núcleo y el desarrollo de sus funciones, la quinasa aPKC debe fosforilar a la subunidad IKK β de la quinasa IKK (o también denominada NEMO), dado que el factor NF- κ B en su forma inactiva se encuentra secuestrado en el citoplasma por I κ B. Una vez que IKK es activada mediante su fosforilación, estará en condiciones de fosforilar a I κ B α . Por lo tanto, tras la fosforilación de I κ B α , NF- κ B se libera y I κ B α es degradada a través del proteosoma, debido a su cambio conformacional para ser ubiquitinizado con residuos de Lys-48. Tras ser liberado NF- κ B y activado, se transloca al núcleo donde puede inducir la transcripción de genes implicados en la diferenciación o supervivencia celular^{182,185,190-193}. La activación del complejo TAB1-TAB2-TAK1 (TABs) gracias a la ubiquitinización de TRAF6, interviene tanto en la fosforilación de la quinasa IKK y, por ende, en la translocación del factor NF- κ B al núcleo¹⁹⁴, como en la síntesis del factor de transcripción AP-1, a través de la vía MAPK-p38, facilitando su traslocación al núcleo e induciendo la transcripción de diferentes genes implicados tanto en la maduración como en la activación del osteoclasto (diferenciación y supervivencia)¹⁹⁵.

En relación a la retroalimentación negativa de este proceso, se inicia cuando los osteoclastos alcanzan su madurez, siendo necesaria una señal negativa que frene tanto su proliferación como su activación. Esta regulación negativa consiste en el bloqueo de la activación de la vía NF- κ B, proceso en el que la proteína p62 presenta

una doble función; por un lado favorece la activación de la proteína CYLD mediante la ubiquitinización con residuos de Lys-63. Esta proteína CYLD es una desubiquitinasa y tras ser activada, favorece la desubiquitinización de la proteína TRAF6 y con ello inhibe la activación de la vía NF- κ B y, por lo tanto, detiene la maduración y activación de los osteoclastos¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Y la otra función de la p62 en la regulación negativa de la ruta NF- κ B, es su autodegradación gracias a la presencia de sus dominios PEST¹⁸⁷. Estos dos dominios PEST son ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que actúan como péptido señal dirigiendo la degradación de proteínas de vida media corta¹⁹⁶.

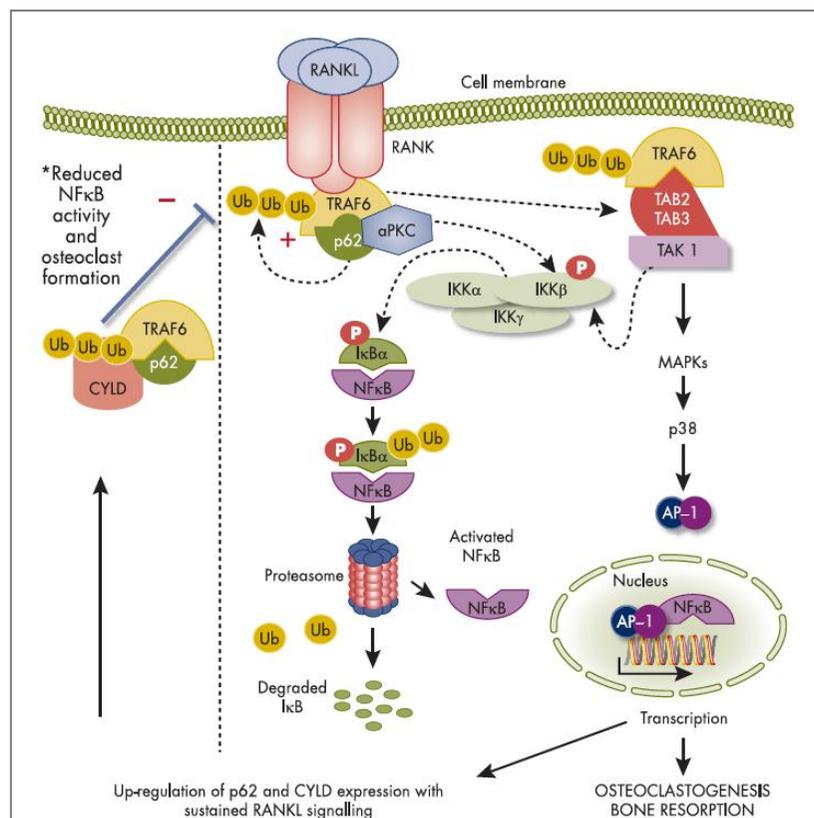


Figura 14. Regulación positiva y negativa de la vía señalización RANK-TRAF6- SQSMT1-NF- κ B en la osteoclastogénesis. [Adaptado de Rea, S, 2013]¹⁸⁷.

1.2.2.2. Degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteosoma.

Las células mantienen un estado de renovación permanente a través de la continua síntesis y degradación de todos los componentes intracelulares, incluyendo proteínas solubles y orgánulos, para evitar la formación de agregados intracelulares. Los dos

mecanismos que regulan y mantienen el contenido son: el sistema ubiquitina proteosoma (UPS) y la autofagia.

El sistema ubiquitina-proteosoma es la mayor vía de degradación independiente del lisosoma (extralisosomal) (figura 15)³²⁶. Es un proceso muy selectivo, ya que tan solo degrada proteínas de vida media corta, aquellas defectuosas o con un plegamiento anómalo, o proteínas que ya han cumplido su función e incluyendo aproximadamente el 30% de las proteínas sintetizadas de novo. Para llevar a cabo este proceso de degradación proteica por este complejo proteico multicatalítico ATP-dependiente denominado proteosoma 26S, es necesario que las proteínas sean marcadas previamente a través de la ubiquitinación con residuos de Lys-48²⁰⁰. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona en la que una pequeña proteína de 8,5 kDa denominada ubiquitina es unida covalentemente a una proteína²⁰³. La ubiquitinación es un proceso secuencial y reversible que requiere de la acción de 3 enzimas clasificadas como E1 activadoras, E2 conjugadoras y E3 ligasas, finalmente, tras su activación la ubiquitina es unida covalentemente a un residuo de Lys-48 de una proteína específica mediante la acción de una E3 ubiquitin ligasa, siendo esta la responsable de catalizar la transferencia de ubiquitina a la proteína sustrato destinada a ser degradada por el sistema UPS²⁰⁴. El proteosoma 26S es un complejo multiproteico cilíndrico compuesto por una unidad central con un coeficiente de sedimentación de 20S que se encuentra flanqueado por dos unidades reguladoras de 19S. Si bien, la unidad central de 20S posee la actividad proteolítica del complejo, las unidades reguladoras a sus extremos son necesarias para el reconocimiento del sustrato a degradar, su desplegamiento y la translocación hacia la unidad central. Una vez que la unidad 19S reconoce el sustrato a ser degradado, la subunidad Rpn11/Poh1 escinde la cadena de poliubiquitina, permitiendo que las subunidades de ubiquitina que formaban la cadena puedan ser recicladas. Finalmente, el sustrato es translocado, dentro de la unidad central, es degradado mediante sus distintas actividades proteolíticas como la actividad hidrolasa, obteniéndose como producto la generación de péptidos cortos y ubiquitina libre, permitiendo su reciclaje. Una de las características principales de la proteína p62 es su capacidad para ubiquitinar a otras proteínas, participando activamente en la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteosoma. A través de su dominio UBA es capaz de llevar a cabo la poliubiquitinización de las proteínas y a

través de su dominio PB1, es capaz de interactuar con la subunidad Rpt1 del proteosoma 26S, favoreciendo la degradación proteica ^{187,201,202,204}.

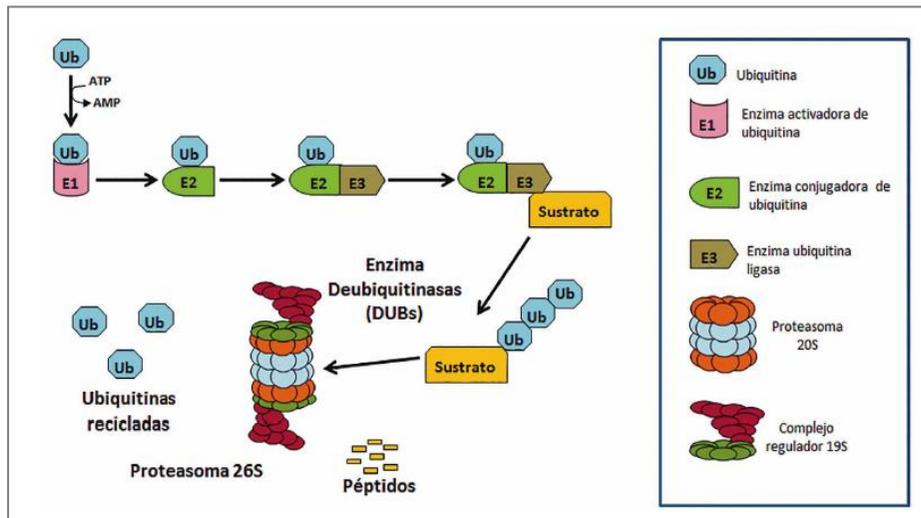


Figura 15. Degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). [Adaptado de Zapata, C, 2015]³²⁶

1.2.2.3. Autofagia

La autofagia se considera un proceso catabólico, intracelular, altamente regulado, mediado por la acción de enzimas lisosomales, y muy conservado evolutivamente. Es una vía de degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, glucógeno y nucleótidos), de orgánulos celulares, principalmente de larga duración y al mismo tiempo, aclara los agregados de proteínas ubiquitinadas que aparecen durante el estrés celular o incluso, las proteínas con plegamiento anómalo²⁰⁶.

Numerosos estudios han demostrado que la autofagia juega un papel esencial en el desarrollo, diferenciación, y en el mantenimiento de la homeostasis celular, definiéndolo como un importante proceso de renovación citosólica²⁰⁷. La autofagia es un proceso fundamental a nivel fisiológico, engloba varios tipos de procesos celulares como la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados o agregados proteicos de vida media larga, lo que permite el recambio de diversos orgánulos citoplasmáticos y proteínas, constituyendo un control de calidad intracelular al tiempo que contribuye a la homeostasis energética de la célula, permitiendo la generación de sustratos como aminoácidos y otras moléculas obtenidas durante la digestión del material citoplasmático, para la síntesis de ATP durante los episodios de carencia de nutrientes

o de incremento del estrés oxidativo o necesidad de un aporte energético adicional²⁰⁷. Además, la autofagia es un componente crucial en la respuesta a la inmunidad innata, la eliminación de patógenos, el transporte de moléculas endógenas y exógenas al compartimiento intracelular, la modulación de la actividad del inflammasoma, el control de la secreción de citoquinas y la regulación de la fagocitosis. Asimismo, interviene de forma relevante en los procesos de desarrollo y diferenciación de los tejidos, pudiendo llegar a determinar la muerte celular bajo circunstancias específicas por lo que a la autofagia también se la denomina en ocasiones “muerte celular programada de tipo II”²⁰⁶. Se ha constatado que la desregulación de esta vía está implicada en el desarrollo de enfermedades tales como enfermedades infecciosas, procesos neoplásicos, la obesidad, el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington)²¹⁵.

Se han descrito tres mecanismos de autofagia en función de la forma en la que los componentes citoplasmáticos son dirigidos al lisosoma²⁰⁷, como son: 1. La autofagia mediada por chaperonas, donde las proteínas se unen a chaperonas y se translocan al interior del lisosoma al ser reconocidas por la proteína de membrana asociada al lisosoma 2A (LAMP-2A) 2. La microautofagia, los componentes citoplasmáticos son secuestrados directamente por el lisosoma. 3. la macroautofagia caracterizada por la formación de autofagosomas que dirigen el contenido citoplasmático al lisosoma para su degradación²⁰⁷. Este último mecanismo de autofagia es el mejor caracterizado, y el más relacionado con la fisiopatología de la EOP, por lo que nos centraremos en este mecanismo de autofagia.

Durante el proceso de autofagia, se forman vesículas lipídicas que engloban al material que será degradado; estas vesículas de doble membrana reciben el nombre de autofagosomas. Los autofagosomas se fusionan con lisosomas formando el autofagolisosoma, donde el material originalmente encapsulado es degradado por los enzimas lisosomales, principalmente hidrolasas²⁰⁷. Este proceso es selectivo y se realiza principalmente a través de la proteína p62, proteína implicada en la activación de la autofagia (figura 16)²¹². En primer lugar se produce la dimerización de la proteína p62 a través de su dominio PB1, posteriormente y una vez formados los acúmulos de proteína p62, se produce la unión y la ubiquitinización de las proteínas a través de su dominio UBA, y finalmente estos acúmulos de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma, provocando su degradación al unirse al lisosoma. Este anclaje se

produce por la interacción del dominio LIR de la proteína p62 a la proteína LC3, y está proteína LC3 se unirá a la membrana del autofagosoma. Tanto la proteína p62 como la proteína LC3 serán eliminadas en el proceso de autofagia junto con el resto de proteínas previamente marcadas con ubiquitina²¹²⁻²¹³.

Existen diversas evidencias que sugieren que la EOP puede estar asociada a una desregulación de la macroautofagia pudiendo contribuir a la patogenia de la EOP^{205,214}. Una de estas evidencias proviene de la observación que en pacientes con EOP se han encontrado mutaciones en los genes *SQSMT1*, *VCP* y *OPTN*, genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de autofagia⁴¹. Asimismo, se ha descrito una mayor expresión de genes relacionados con la autofagia, como *SQSMT1*, *ATG5* y *LC3* en un modelo murino caracterizado por ser portador de la mutación p.P392L en el gen *SQSTM1*¹⁴⁰. Además, la p62/SQSTM-1 es una proteína muy vinculada en una gran cantidad de vías señalización y se ha observado su acumulación en células deficientes del proceso de autofagia, lo que confirma que es reconocida y degradada por este mecanismo. Asimismo, p62/SQSTM1 tiene un dominio UBA de unión a ubiquitina y un dominio LIR de interacción a la proteína LC3, por lo que las proteínas ubiquitinadas y cuerpos de inclusión pueden ser reclutados a través de la membrana del autofagosoma y ser degradados posteriormente por los enzimas lisosomales. Por consiguiente, en pacientes afectos de EOP se han detectado niveles más elevados de la proteína p62, independientemente de si los pacientes son o no portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1*, constatando la existencia de una probable autofagia defectuosa^{210,142}. Por esta razón, la degradación de p62 es considerada un buen marcador para cuantificar la autofagia²⁰⁹.

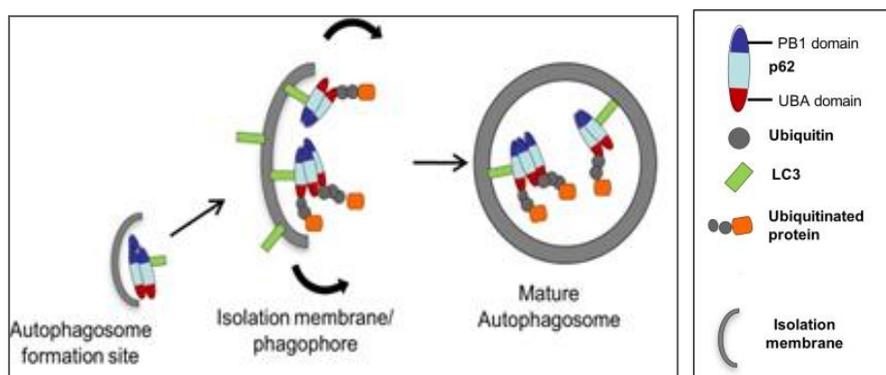


Figura 16. La proteína p62 en la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados mediante el proceso de autofagia. La proteína p62 crea dímeros que unen y ubiquitinizan a las proteínas que serán eliminadas; los agregados de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma

mediante la interacción entre la proteína p62 y la proteína LC3 [Adaptado de Donohue, E y col, 2014]²¹²

1.2.2.4. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo esencial para entender múltiples fenómenos biológicos, constituye un mecanismo de muerte celular activa y programada, definido por cambios tanto morfológicos como bioquímicos, que participa en el desarrollo y la homeostasis de los organismos y cuya finalidad es la eliminación de células innecesarias o causantes de un posible peligro, de una forma controlada que minimiza el daño en su entorno. A nivel morfológico, destacan una serie de características como son la reducción de tamaño celular, alteraciones en la membrana plasmática y la pérdida de adhesión a las células vecinas. Las características bioquímicas asociadas a este proceso incluyen la condensación de la cromatina (picnosis) y la fragmentación internucleosomal del ADN (cariorrexis), así como la externalización del fosfolípido fosfatidilserina, reorganización de componentes citoplasmáticos y el procesamiento proteolítico de sustratos intracelulares a partir de enzimas denominadas caspasas¹⁸⁷. Finalmente las células apoptóticas serán fagocitadas por macrófagos o células adyacentes. Las caspasas son enzimas proteolíticas, responsables de la apoptosis en todas las especies, debido a que sus secuencias se encuentran muy conservadas evolutivamente. Actualmente, se conocen más de 14 caspasas, que se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su función dentro del proceso apoptótico, las caspasas iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras son entre otras, la caspasa-8 y la 9 y son activadas por una cascada de señales ascendentes, y éstas a su vez activan a las caspasas efectoras (caspasa 3 y 7). Las caspasas se encuentran en el citoplasma en forma de proenzimas inactivas y pueden ser activadas por distintos estímulos que pueden clasificarse según su origen; en la cascada generada por la vía extrínseca o por los receptores de muerte de la membrana citoplasmática, o por el contrario, en la cascada desencadenada por cambios en la integridad mitocondrial o vía intrínseca^{187,217-219}. Por lo tanto, existen principalmente dos vías que pueden desencadenar la apoptosis en una célula: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca se induce intracelularmente, y puede estar activada por el estrés celular oxidativo o por el daño en el ADN, estos estímulos causan una cascada de señales que desembocan en la mitocondria, liberándose el citocromo-c que junto con APAF-1, ("factor 1 activador de la proteasa apoptótica"), activaran a la caspasa -9 y ésta a su vez, activa a la caspasa-3 y 7, causando la muerte

celular²¹⁷⁻²¹⁹. Por el contrario, la vía extrínseca es activada por estímulos externos a la célula conectando el espacio extracelular con la maquinaria apoptótica. Esta vía se activa mediante el factor proapoptótico TRAIL (“ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF”) que se une a sus receptores específicos transmembrana DR (“receptores de muerte”), como DR4 y DR5 localizados en la membrana plasmática de la célula. Tras la unión del ligando al receptor DR, se produce una trimerización del receptor con proteínas intracelulares relacionadas con la muerte celular (FADD (“dominio de muerte asociado a Fas”), RIP1 (“proteína 1 que interactúa con el receptor”), formando un complejo supramolecular denominado DISC (“complejo de señalización inductor de muerte”), que constituye la plataforma que regula la activación de las procaspasas 8 y 10, en caspasas iniciadoras¹⁸⁷. Estas caspasas posteriormente, inducen la activación de las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7), y finalmente provocan la muerte celular apoptótica. La vía intrínseca y la extrínseca pueden confluir, de manera que la caspasa-8 puede ser activada por los receptores de muerte (DR) o bien ser activada por Bid (proteína proapoptótica perteneciente a la familia de BCL-2), un potente activador de la vía intrínseca. La proteína p62 lleva a cabo un papel crucial en la ruta apoptótica extrínseca: la proteína p62, a través de su dominio UBA, facilita la agregación y la activación de la caspasa 8 mediante su ubiquitinización, permitiendo que se activen las caspasas efectoras, pudiéndose llevar a cabo la apoptosis^{187,220}. Además de las caspasas, existe otra gran familia de proteínas protagonistas en el proceso de apoptosis. Se trata de las proteínas de la familia Bcl-2, clave en la vía intrínseca de activación de la apoptosis. En los pacientes afectados de EOP, se ha observado que el gen Bcl-2 (“célula B del linfoma-2”), un inhibidor de la apoptosis de la vía intrínseca, está incrementado en las muestras de osteoclastos procedentes de EOP en comparación con los controles sanos²²¹. Asimismo se ha observado que la apoptosis se encuentra atenuada en los osteoclastos pagéticos en respuesta a TRAIL y a otros factores inductores de apoptosis, así como en respuesta a la eliminación de los factores de supervivencia de osteoclastos como CSF-M y RANKL²²³. Esto puede explicarse parcialmente por la expresión diferencial de genes proapoptóticos, específicamente CASP3 (caspasa-3) y TNFRSF10A (TRAIL-R1), que están regulados a la baja en los osteoclastos derivados de EOP en comparación con controles sanos²²².

1.2.2.5. Regulación del estrés oxidativo inducido por el sistema Keap1/Nrf2

En condiciones normales, en el organismo existe un constante equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que son generados como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida de este balance conlleva a la aparición de un estado denominado estrés oxidativo. Este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) que no alcanzan a ser compensado por los sistemas antioxidantes, causando daño y muerte celular. Esto acontece en diferentes patologías como en la degenerativas, metabólicas, infecciosas, inmunes e inflamatorias. Las especies reactivas de oxígeno se generan constantemente durante el metabolismo oxidativo celular, y juegan un papel central en la homeostasis ósea a través de la estimulación de la osteoclastogénesis, inhibición de los osteoblastos y la inducción de la apoptosis de los osteocitos²²⁴. RANKL induce la producción ERO de vida media larga que son cruciales en las últimas etapas de la osteoclastogénesis y en la regulación de la resorción ósea^{225,226}. El principal mecanismo de defensa celular para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, incluyendo ERO y el óxido nítrico, es el sistema Nrf2-Keap1²²⁹. Entre los factores de transcripción que se activan por ERO destacan el NF-κB, la proteína activadora 1 (AP1) y los factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocidos como Nrf2 (“factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2”).

El factor de transcripción Nrf2 (“factor nuclear eritroide-2”) presenta una función citoprotectora principalmente, a pesar que es capaz de regular diferentes cascadas de señalización de proteínas quinasas que participan en la autofagia y apoptosis, además interviene en procesos de diferenciación, proliferación y maduración celular, con un impacto positivo en la regulación de la diferenciación osteoblástica²²⁷. Nrf2 es uno de los mayores guardianes celulares, siendo inducible su expresión frente al estrés oxidativo²²⁷.

Nrf2 presenta una distribución ubicua y una de sus principales características en relación a su actividad reside en su regulación espacio-temporal, de manera que Nrf2 se mantendrá activo mientras dure el estímulo que promueve su activación. Este factor de transcripción Nrf2, pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La región básica de Nrf2 es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región ácida es necesaria para la activación transcripcional²²⁸. El factor de transcripción Nrf2 contiene

609 aminoácidos y se divide en 6 dominios funcionales denominados Neh 1-6. (figura 17). El dominio Neh2 regula negativamente a Nrf2 a través de su capacidad para interactuar con la proteína Keap1. Los dominios Neh1 y Neh 3 comprenden la región Nrf2 de unión al ADN y por lo tanto, regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y de proteínas antioxidantes (p.e., superóxido dismutasa de manganeso, Hemo oxigenasa-1, sulfiredoxina y NQO1), mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE ("Elemento de respuesta antioxidante")^{229,238}. En condiciones normales, la actividad del factor Nrf2 se encuentra inhibida constitutivamente debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap1 y al citoesqueleto. La interacción de Keap1 (por medio de sus dominios de hélice β Kelch) con Nrf2 (en los motivos *ETGE* y *DLG* del dominio Neh2) es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol, por lo que Keap1 forma un multicomplejo estructural en el que comparte sus láminas- β tanto con Nrf2 como con los filamentos de actina del citoesqueleto, confirmando que el complejo Keap1-Nrf2 se forma y se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto^{231,232}. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento por el proteosoma 26S, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de *nov*. La degradación de Nrf2 es un evento constitutivo que no requiere ninguna modificación post-transcripcional del sustrato y se ha sugerido que esto puede deberse a que Keap1 funciona como un adaptador de sustratos al proteosoma.

La proteína Keap1 ("proteína 1 asociada a ECH parecida a Kelch") está formada por 624 aminoácidos y consta de cinco dominios, de los cuales dos se consideran como dominios canónicos, evolutivamente muy conservado (figura 17). Keap1 es una proteína adaptadora que une a Nrf2 con la ligasa E3 tipo Cullin-3 y es esencial para la degradación constitutiva de Nrf2 por el proteosoma en ausencia de estímulos de estrés celular (figura 18). Keap1 suprime hasta en un 80% la translocación nuclear de Nrf2 y por lo tanto la actividad transcripcional de Nrf2. En cambio, en condiciones de estrés oxidativo, o en un ambiente con estresores electrófilos o en presencia de compuestos que tiene como diana la activación de Nrf2, Keap1 se inactiva debido a modificaciones conformacionales, como consecuencia de la oxidación en ciertos residuos de cisteína por ERO, lo que facilita su disociación de Nrf2 y detención de la ubiquitinación de Nrf2 y por ende su degradación, lo que lleva a la activación de Nrf2 y su translocación al

núcleo, formando heterodímeros con las pequeñas proteínas Maf (Maf-muscle aponeurotic fibrosarcoma), facilitando su interacción con las regiones ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes citoprotectores²⁴¹. Estos genes pueden codificar para enzimas antioxidantes, enzimas de reparación de ADN, enzimas detoxificantes, proteínas de respuesta antiinflamatoria, entre otros, aumentando la capacidad celular para reparar los posibles daños. Posteriormente, cuando la célula alcanza su estado fisiológico, esta síntesis cesa y se restaura la vía.

En ausencia de estrés oxidativo (figura 18), Nrf2 queda secuestrado en el citosol, donde se une a un homodímero de Keap1; Nrf2- Keap1 se reprime más por la unión a la ligasa Cullin-3, que a su vez se une a Rbx1 (ANILLO-box proteína 1) para formar un complejo Keap1-Cul3- Rbx1 E3 ligasa de ubiquitina que dirige a Nrf2 a su degradación proteosomal. Keap1 contiene al menos cuatro residuos de cisteína esenciales (en las posiciones 23, 151, 273 y 288), la oxidación de uno de ellos (Cys151) determina la liberación y adaptación de Nrf2 al estrés oxidativo^{229,231-234}.

La proteína Keap1 tendría una función dual, por un lado ser un adaptador de la ligasa Cullin-3 para la degradación de Nrf2 y al mismo tiempo un sensor de estrés oxidativo.

En la vía no canónica de Keap1-Nrf2, la proteína p62/SQSTM1 fosforilada en Ser349 (p-STGE) se une competitivamente a Keap1, disociando así el factor de transcripción Nrf2 de Keap1 (figura 18). En consecuencia, el Nrf2 estabilizado se transloca al núcleo junto con Maf, interaccionando con las regiones ARE del ADN e induciendo la transcripción de genes citoprotectores^{235,241}. El eje p62/SQSTM1-Keap1-Nrf2 está vinculado a la autofagia selectiva y regulado por modificaciones postraduccionales como la fosforilación secuencial y la ubiquitinación de p62/SQSTM1.

Diferentes estudios han demostrado una interacción física y una relación funcional con Keap1²⁴¹. SQSTM1 p62 interactúa con Keap1, con los aminoácidos 347–352 de SQSTM1/p62 constituyendo la región de interacción a Keap1 (KIR)^{241,237,243}. Esta interacción física tendría lugar entre los residuos localizados entre DPSTGE de p62 (estructuralmente semejantes al motivo ETGE de Nrf2) y tres argininas del dominio Kelch del Keap1²⁴². El sitio de unión SQSTM1/ p62 en Keap1 se superpone con el sitio de unión Nrf2 a Keap1. En este sentido, se sugiere que p62 tiene un papel en la regulación de Keap1 y su degradación a través de la autofagia, dependiendo de la capacidad de reacción celular frente a determinados estresores. Por lo tanto, SQSTM1/ p62 compite con Nrf2 por la unión de Keap1, de modo que la sobreexpresión de

SQSTM1 / p62 en personas con deficiencia de autofagia conduce a la estabilización de Nrf2 y la consiguiente inducción sostenida de enzimas citoprotectoras, resultando efectos aberrantes ocasionando la aparición de enfermedades²⁴¹. De la misma manera, la sobreexpresión de p62 celular conlleva a una depleción en los niveles de Keap1, mientras que su silenciamiento restaura los niveles de la misma y disminuye los niveles de Nrf2 a nivel proteico, con reducción de la expresión génica dependiente de ARE, debido a un aumento en la vida media de Keap1 en ausencia de p62, por una disminución en su degradación²⁴³. Asimismo, las últimas publicaciones señalan que la proteína p62 fosforilada (p-p62)²⁴⁴, es la verdadera responsable de la interacción con Keap1, al mostrar una mayor afinidad por él. Esta proteína p62 fosforilada sirve de adaptador entre la autofagia y presencia de complejos ubiquitinados, siendo capaz de disociar el complejo Nrf2/Keap1 o bien que en condiciones de estrés promueven un cambio conformacional de Keap1 y en este momento p62 toma ventaja en el sitio de unión vacío uniéndose a Keap1 y a LC3²⁴¹.

Por otro lado, NF-κB es un factor transcripcional implicado en múltiples procesos celulares incluyendo apoptosis, inflamación y supervivencia celular. NF-κB se asocia con su inhibidor IKKB en el citoplasma y se activa por la fosforilación de IKB por sus respectivas quinasas (IKK), que promueven la disociación del complejo y la consecuente translocación nuclear. Este factor adquiere importancia cuando se estudia la vía Nrf2/Keap1 ya que muchos agentes quimiopreventivos capaces de activar a Nrf2 reprimen la actividad de NF-κB, además este último puede suprimir la transcripción de genes dependientes de ARE. Este hecho, junto a la identificación de una región de unión para NF-κB en la región promotora de Nrf2, sugiere que Nrf2 podría estar regulado por NF-κB. Además se ha demostrado que Keap1 tiene capacidad de unirse a IKKB, un miembro del complejo IKK, promoviendo su ubiquitinación y degradación, de tal manera que Keap1 disociado juega un papel crucial en la regulación negativa de la vía NF-κB²⁴⁶.

Por consiguiente, la p62 es considerada una proteína adaptadora, multidominio y multifuncional, con capacidad de interactuar en múltiples vías de señalización de forma sinérgica y sincrónica, favoreciendo las conexiones entre las diferentes proteínas y por ende la regulación de las mismas, es decir actuando como nexo de unión entre diferentes procesos como la supervivencia, activación y diferenciación del osteoclasto mediada por la vía de señalización RANK-TRAF6-NF-κB, en la apoptosis mediada por

las caspasas, en la degradación proteica a través del sistema ubiquinina-proteosoma (UPS), así como en el proceso de autofagia y en la regulación del estrés oxidativo inducido por la ruta Keap1/Nrf2^{182,183}.

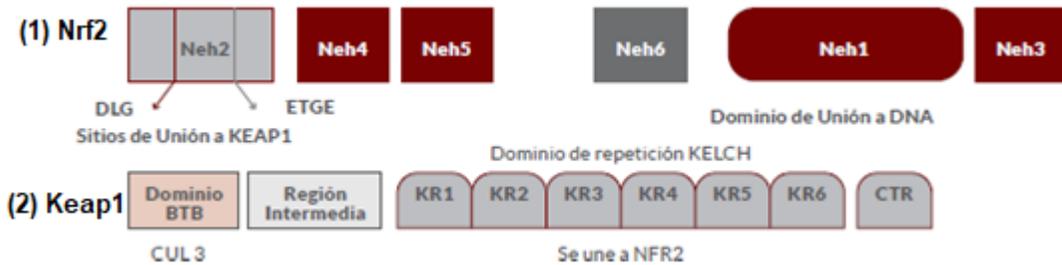


Figura 17. Estructuras de Nrf2 y Keap1. (1) Los dominios de NRF2: Neh1-6. En el dominio Nrh2 se encuentran los sitios de unión a Keap1 los motivos ETGE y DLG. El motivo DLG se encuentra en la región hidrofóbica, las letras D, L y G son los símbolos de una letra de los aminoácidos ác. aspártico, leucina y glicina, respectivamente; mientras que el motivo ETGE está formado a su vez por los aminoácidos ác. glutámico, treonina, glicina y ác. glutámico. En el dominio Neh2 también se encuentran siete residuos de lisina que son importantes para su ubiquitinación y degradación. Los dominios Neh1 y Neh 3 comprenden la región NRF2 de unión al ADN. (2). Los dominios KEAP1. El dominio BTB es responsable de la dimerización de dos subunidades de KEAP1 y de la unión de la ligasa E3 tipo Cullin-3 que sirve de adaptador para unirse al proteosoma, el dominio de repetición de Kelch o dominio DGR provee el sitio de unión a Nrf2 y a actina, mientras que la región intermedia o IVR contiene a los residuos de cisteína, capaces de oxidarse y registrar el estado oxidativo de la célula. Abreviaturas: CTR, la región C-terminal; KR, Kelch-repetición. [Adaptada de Hayes, D.J, 2019]²³⁹

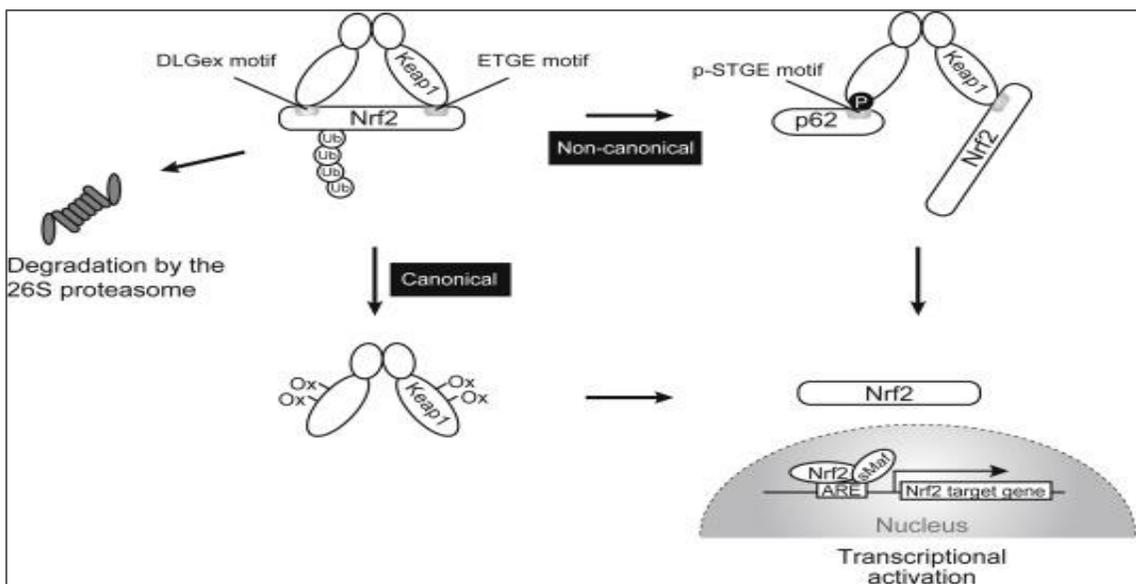


Figura 18. Vías canónicas y no canónicas Keap1-Nrf2 . [Adaptado de Yoshinori Katsuragi, 2016]²³⁵

1.2.3. Proteína p62/SQSTM1 en la enfermedad ósea de Paget

Alteraciones en la proteína p62 causan un desacoplamiento en la activación de la ruta RANK-TRAF6-NF- κ B que se traduce en un gran incremento de la osteoclastogénesis, base patogénica del desarrollo de la EOP²⁴⁷. Una de las características principales de la proteína p62 es su capacidad para ubiquitinar a otras proteínas. Este marcaje con residuos de ubiquitina es posible gracias al dominio UBA de la proteína p62^{262,263}. La capacidad de ubiquitinización de la proteína p62 será la base para el resto de sus funciones. La mayor parte de los pacientes portadores de mutaciones en la proteína p62 tienen la mutación localizada en la región C-terminal, en el dominio UBA de la proteína p62. El dominio UBA juega un papel importante en la regulación negativa de la activación de la ruta NF- κ B. Mediante la ubiquitinización con residuos de Lys-63 es capaz de activar a la proteína CYLD y esta proteína activada, desubiquitina a la proteína TRAF6 y con ello frena la activación de la ruta NF- κ B y, por ende, inhibe la maduración y activación de los osteoclastos. En los pacientes portadores de mutaciones en el dominio UBA, la proteína p62 no es capaz de activar correctamente a la desubiquitinasa CYLD, por lo que no se produce la inhibición de la activación de la ruta NF- κ B, provocando una hiperestimulación de la misma, lo que desemboca en el desacoplamiento en la osteoclastogénesis con un incremento de la actividad osteoclástica, favoreciendo el desarrollo de la EOP (figura 19)^{248,2,187}.

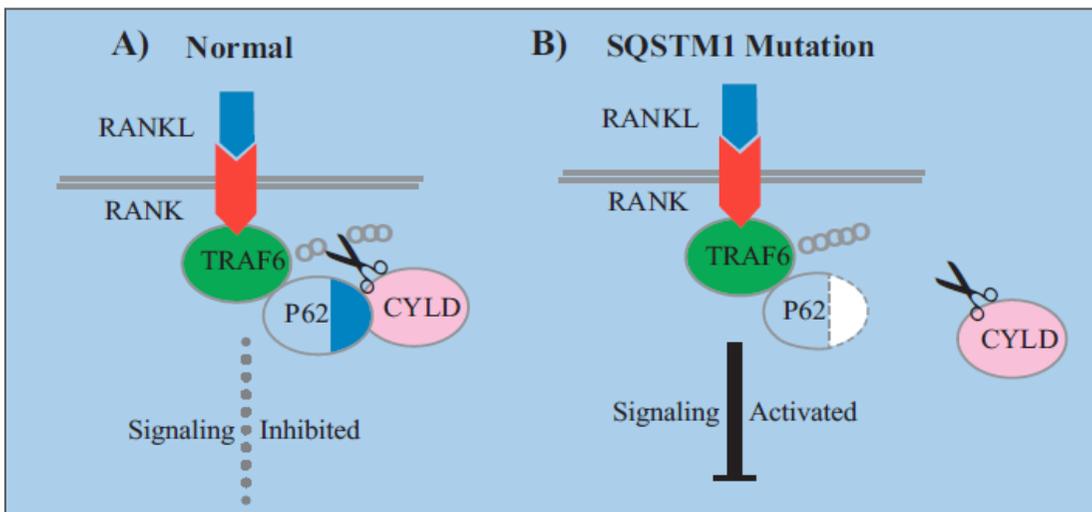


Figura 19. Eje RANK-TRAF6-p62-NF- κ B. (A) En condiciones normales, la proteína p62 ubiquitina a la proteína CYLD, produciéndose el bloqueo de la osteoclastogénesis. (B) En los pacientes portadores de mutaciones en el dominio UBA de la proteína p62 no son capaces de activar a la proteína CYLD, ocasionando un desacoplamiento en la osteoclastogénesis, que conlleva al desarrollo de la EOP. [Adaptado de Ralston SH, Layfield R, 2012]²

La mutación más común y la primera en describirse, es el cambio de dos aminoácidos, una prolina por una leucina en el codón 392 (P392L), fue identificada tanto en los casos familiares como en los esporádicos de diferentes poblaciones estudiadas como la población de ascendencia francocanadiense (46% de casos familiares y en el 16% de los casos esporádicos)¹⁵⁷, la población británica (19% de los casos familiares y 8,9% de los casos esporádicos)²⁴⁷, así como en diferentes poblaciones como belga²⁵⁰, italiana²⁵¹ y estadounidense²⁵². Esta mutación también se ha detectado de forma común en la población china, mostrando características clínicas y demográficas similares a la población caucásica portadora de dicha mutación, a pesar de la baja prevalencia e incidencia de la enfermedad en dicha población asiática^{253,254}.

Posteriormente, se han identificado otras mutaciones en dicho dominio UBA, en pacientes de distintos países^{142,255,256,257}. Aunque no podemos excluir la posibilidad de que el dominio UBA del gen *SQSTM1* constituya un “hotspot” mutacional, los resultados de un estudio realizado en familias inglesas, australianas y neozelandesas demuestran que la mutación P392L se segrega en un haplotipo común en la mayoría de los casos. Esto sugiere un fuerte efecto fundador, es decir, que al menos en estas poblaciones de origen británico, muchos de los pacientes pueden descender de un ancestro común (mutación fundadora en un haplotipo ancestral)^{258,255,259,157}.

Hasta la fecha, se han descrito 28 mutaciones en el gen *SQSTM1* (figura 20), 21 de ellas son mutaciones “*missense*” que ocasiona un cambio de un aminoácido y las otras 7 mutaciones conducen a una proteína truncada⁵⁸. Los pacientes afectados de EOP portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1*, muestran un fenotipo más severo, inicio más precoz de la enfermedad, con mayor extensión y actividad en el momento del diagnóstico en comparación con la población de pacientes no portadores de mutaciones en dicho gen^{257,247}. Asimismo este fenotipo tiende a ser más grave en pacientes portadores de mutaciones en *SQSTM1* que ocasiona una proteína truncada que aquellas mutaciones *missense*^{257,247}. La mayoría de los pacientes presentan una única mutación en el gen, aunque se han identificado varios casos con mutaciones heterocigotas compuestas^{260, 142, 261} y homocigotas de la p.P392L¹²³, no observándose más gravedad en el fenotipo respecto a los pacientes portadores de una mutación única. A pesar que la mayoría de las mutaciones se agrupan dentro del dominio UBA de la proteína p62, hecho que conlleva la desregulación de la ruta de señalización RANK-TRAF6-NFKB, también se han identificado varias mutaciones externas al dominio UBA.

Se han descrito cuatro mutaciones “*missense*” (p.D335E, p.S349T, p.P364S, p. A381V) fuera del dominio UBA de la proteína p62^{142,255,256,257,265}. Estas mutaciones, como p.S349T, localizada en el dominio KIR, también aumentan la señalización de NF-κB, pero sin presentar anomalías en la función de ubiquitinización de la proteína²⁵⁷. Esto ocurre debido a que la mutación p.S349T altera selectivamente la interacción competitiva de SQSTM1-Keap1, ocasionando una disociación de Keap1 lo que conlleva a una reducción de la actividad de Nrf2. Esta alteración en la función Nrf2 podría producir una disminución en la expresión de genes de citoprotectores, contribuyendo a la aparición de EOP. Asimismo, la pérdida de Nrf2 *in vivo* afecta negativamente a la diferenciación de osteoblastos y por ende a la formación de la matriz ósea, por lo que se ha propuesto que mutaciones en el gen SQSTM1 podrían producir alteraciones en el remodelado óseo como se observa en pacientes con EOP debido a la existencia de alteraciones en la actividad de Nrf2.²⁶⁴

Dado que las mutaciones localizadas fuera del dominio UBA como p.D335E y p.P364S están muy próximas a la p S349T, podrían afectar del mismo modo a la actividad de Nrf2, mediante la alteración de la interacción SQSTM1-Keap1^{255,257,256,265}.

En relación a otra mutación que se ha descrito a 50 aminoácidos previos al dominio UBA, como es la mutación p.D335E, localizada en el dominio LIR, región de unión al responsable de la regulación de la autofagia, LC3. Esta mutación podría ocasionar alteraciones en este proceso de autofagia, característico de la fisiopatología de la EOP²⁵⁵. Otras dos mutaciones descritas fuera del dominio UBA, es la p.P364S y la p. A381V, la primera se identificó en la población australiana afecta de EOP, no mostrando alteraciones en el proceso de ubiquitinización²⁵⁷, en cambio la mutación p. A381V, descrita en la población EOP italiana, ejerce efectos deletéreos sobre la función de unión de la ubiquitina de p62¹⁴². A pesar de estas observaciones, en los estudios funcionales realizados con las distintas mutaciones se han mostrado aumentos en la señalización de NF-κB comparado con los controles. Por lo que el desarrollo de la enfermedad podría originarse de alteraciones en diferentes dominios o vías de señalización, dado la complejidad y la ubicuidad de esta proteína adaptadora multidominio.

A pesar de las múltiples investigaciones acerca de la etiopatogenia de la EOP llevadas a cabo durante décadas, sobretodo basadas en estudios moleculares de mutaciones en líneas germinales de estos pacientes, no han aportado un conocimiento completo de

esta enfermedad compleja. El hecho de que la EOP es una enfermedad con un comportamiento focal que muestra una distribución asimétrica desde el diagnóstico, se planteó la hipótesis de la existencia de mutaciones somáticas en la etapa temprana del cigoto que podrían ser responsables del mosaicismo detectado en estos pacientes. De manera consistente, varios estudios encontraron la variante p.P392L como una mutación somática del *SQSTM1* en los huesos afectados de dos pacientes, pero no se detectó en sangre periférica²⁶⁶, o restringido a los monocitos²⁶⁷. Sin embargo, otros grupos de investigación encontraron resultados contradictorios tanto en la detección de mutaciones somáticas de *SQSTM1*, como de otros genes implicados en su etiopatogenia como es el *TNFRSF11A*, tanto en tejidos afectados de pacientes con EOP así como en distintas líneas celulares de osteosarcoma. Por lo tanto en la actualidad, no podemos determinar si las mutaciones somáticas de *SQSTM1* u otros genes contribuyen a la naturaleza focal de esta enfermedad.

La existencia de mutaciones en el gen de *SQSTM1* no parecen exclusivas de la EOP, se han relacionado con otras enfermedades neurodegenerativas, como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la demencia frontotemporal (DFT) tanto esporádicas como familiares^{267,269}. Estas dos entidades son enfermedades neurodegenerativas progresivas que comparten muchos rasgos clínicos, moleculares e histológicos, por lo que se postula que pertenecen a un mismo espectro clínico-patológico de enfermedad. Estas dos entidades muestran una superposición genética importante, se conocen varios genes relacionados: *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *UBQLN2*, *PFN1*, *OPTN*, *VCP*, *MATR3*, *TUBA4A* y *C9ORF72*²⁶⁹. Sin embargo, en un tercio de los casos familiares no se conoce el gen responsable, y tampoco se conoce con detalle el proceso molecular que da lugar a las enfermedades esporádicas. En diferentes estudios realizados de gen candidato y metaanálisis en varias poblaciones (Europa, Estados Unidos y Japón)²⁶⁹⁻²⁷⁴, se han descrito diferentes mutaciones localizadas en distintos dominios (PB1, LIR, PEST1, PEST2, TBS, ZZ, UBA) del gen *SQSTM1*, siendo alguna de ellas patógenas. La frecuencia de mutaciones localizadas en el gen *SQSTM1* se estimó entre 2,42-3,28% en ELA y 1,76-2,13% en DFT^{268,275}. Incluso se ha identificado que las mutaciones localizadas en el dominio UBA del gen *SQSTM1* pueden llegar a duplicar el riesgo a presentar la DFT. Esto se correlaciona con hallazgos histológicos en ambas enfermedades. Por lo que se ha constatado que el *SQSTM1* está implicado en la etiopatogenia de estas dos patologías neurodegenerativas como son la ELA y DFT,

debido a que la proteína p62 desempeña un importante papel en la degradación de proteínas vía proteosoma y a través de la autofagia^{267,269,275}.

La relación existente entre EOP Y DFT se observó, en un primer momento, en el síndrome hereditario conocido con el acrónimo de IBMPFD^{2,276}, caracterizado por miopatía por cuerpos de inclusión, EOP y demencia frontotemporal, causado por una mutación en el gen *VCP* localizado en el Cr 9p21 que codifica la proteína p97, una proteína que está implicada en el sistema de degradación de la vía ubiquitina-proteosoma. La enfermedad presenta una herencia autosómica dominante, siendo la clínica más predominante, acaecida en el 90% de los casos, la miopatía de predominio proximal preferentemente y asimétrica, de aparición a una edad media de 42 años. Histológicamente, revela presencia de vacuolas en anillo y lineales, depósitos amiloides e inclusiones tubulofilamentosas nucleares-citoplasmáticas. La aparición de las lesiones pagéticas con afectación predominantemente en cráneo, axial y pelvis, presentan una penetrancia incompleta del 67%²⁷⁷, siendo la media de inicio a los 47 años (29-61) y por último, la demencia se desarrollaría a los 54 años (39-62a), con una penetrancia del 37%²⁷⁸, siendo la causa de muerte el fallo cardiaco o respiratorio a una edad temprana (~58 años). Diferentes estudios demostraron que la presencia de mutaciones en el gen *VCP* se asociaba a una heterogeneidad clínica importante, concluyendo que no todos los pacientes iban a presentar los tres fenotipos completos. Estudios posteriores han descrito mutaciones en este gen *VCP* en las enfermedades neurodegenerativas como la ELA y DFT^{268,269,275}.

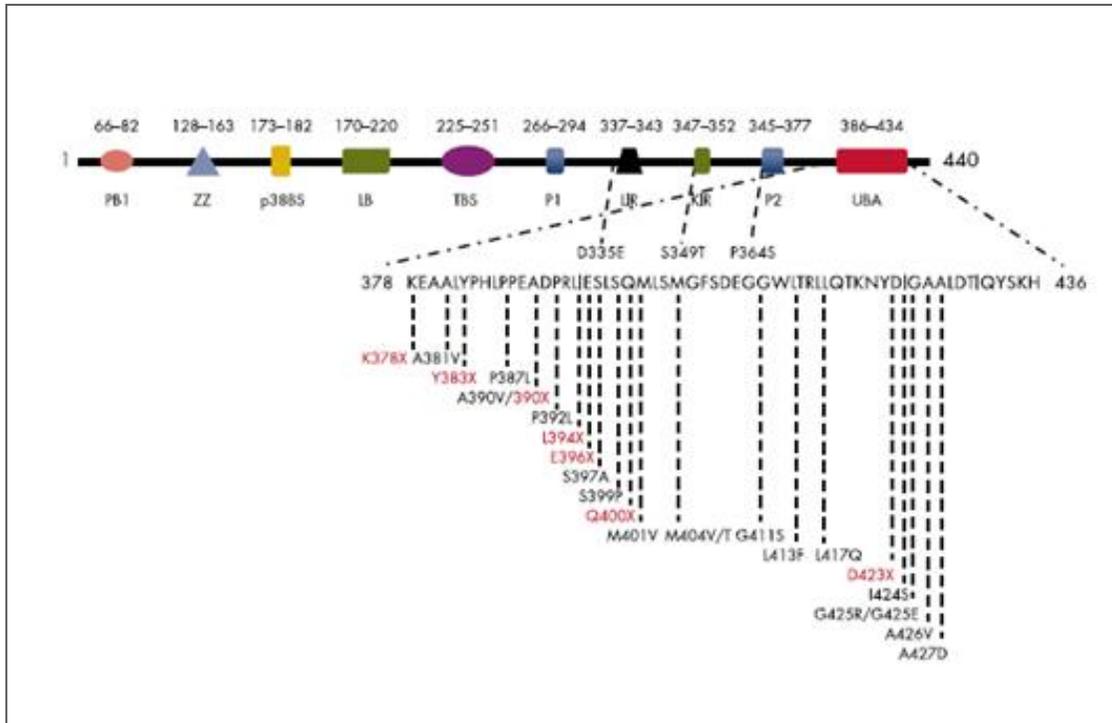


Figura 20. Mutaciones localizadas en los diferentes dominios del gen *SQSMT1* en pacientes afectados de EOP clásica. [Adaptado de Rea S. et al., 2013]¹⁸⁷

1.3. SISTEMA RANKL/RANK/OPG Y ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET.

Las mutaciones descritas en el gen del *SQSMT1* no explicarían de forma completa la patogenia de la EOP, dado que estas mutaciones no se encuentran en la mayor parte de los pacientes, tanto en familiares como en esporádicos, ya que se han descrito en el 20-40% y en el 5-10%, respectivamente, de las series estudiadas^{123,160}. Además, las mutaciones del gen *SQSTM1* muestran una penetrancia incompleta, enfatizando el papel de los factores ambientales y de otros genes modificadores, en la etiología de la enfermedad. Por lo que a día de hoy, se continúa investigando la existencia de mutaciones en otros genes asociados a esta entidad, debido a la heterogeneidad genética que presenta^{279,124}. Los candidatos más claros son aquellos que, al igual que el gen *SQSMT1/p62*, están relacionados con la osteoclastogénesis. El sistema RANKL/RANK/OPG constituye una vía de señalización clave en la determinación del balance del remodelado óseo, siendo un sistema de comunicación intercelular que regula especialmente la osteoclastogénesis, tanto la diferenciación como la activación de los osteoclastos^{89,96}. El equilibrio entre OPG y RANKL y la unión de este último a su

receptor RANK es clave en la determinación del estado anabólico o catabólico del hueso. Una alteración en dicho sistema de señalización RANKL/RANK/OPG provocaría una desregulación del remodelado óseo y como consecuencia estados patológicos que afectan principalmente al metabolismo óseo como en la EOP²⁸⁰.

La importancia del sistema RANK/RANKL/OPG como regulador fisiológico de la remodelación ósea en humanos se ha demostrado mediante la identificación de mutaciones en componentes de esta vía en sujetos con enfermedades óseas hereditarias caracterizadas por un aumento del recambio óseo, con fenotipos similares a la EOP clásica (figura 21)²⁸¹. Por lo tanto, individuos con mutaciones con pérdida de función y/o deleciones que afectan al gen *TNFRSF11B* (OPG), conducen a un mayor acceso de RANKL a RANK, y facilita el desarrollo de la Enfermedad de Paget Juvenil (JPD, Juvenile Paget's disease)^{281, 282}, un trastorno poco frecuente, de aparición en la infancia o en la niñez con una tasa de recambio óseo elevada, deformidad ósea progresiva, dolor óseo generalizado, fracturas óseas patológicas y sordera, que recuerdan a la EOP clásica.

Otro gen involucrado en la aparición de estos trastornos hereditarios óseos, es el gen *TNFRSF11A*, que codifica la proteína RANK, donde la presencia de una activación constitutiva de RANK, debido a la existencia de mutaciones de inserción en el exón 1, favorece el desarrollo de diferentes patologías como la osteólisis expansiva familiar (FEO, familial expansile osteolysis), la hiperfosfatasa esquelética expansiva (ESH, Expansile skeletal hyperphosphatasia) y la enfermedad ósea de Paget familiar de inicio temprano, EOP juvenil y la enfermedad panostótica expansiva ósea^{154,155,283,284,315,316}. Estas mutaciones interfieren en el procesamiento normal de la proteína RANK y provocan la activación de los osteoclastos a través de la activación del NF-κB independientemente de la estimulación del RANKL. Estos síndromes son trastornos graves, presentan una herencia autosómica dominante con una alta penetrancia, y se manifiestan con sordera y pérdida de dentición en la infancia y en la adolescencia seguida del desarrollo de lesiones osteolíticas expansivas en la edad adulta temprana²⁸¹.

Dado que estas patologías óseas hereditarias comparten características clínicas, radiológicas e histológicas con la EOP clásica, y los genes implicados en su desarrollo juegan un papel importante en la osteoclastogénesis a través de la ruta de señalización RANK/RANKL/OPG/NF-κB, la mayor parte de la atención investigadora en la búsqueda

de genes candidatos en relación al desarrollo de la EOP clásica, se ha centrado en estos genes *TNFRSF11A* y *TNFRSF11B*. A pesar de estas evidencias, en la actualidad, no se han identificado mutaciones en los genes *TNFRSF11B* (OPG) y *TNFRSF11A* (RANK) como causa de EOP clásica^{154,283,286-287}.

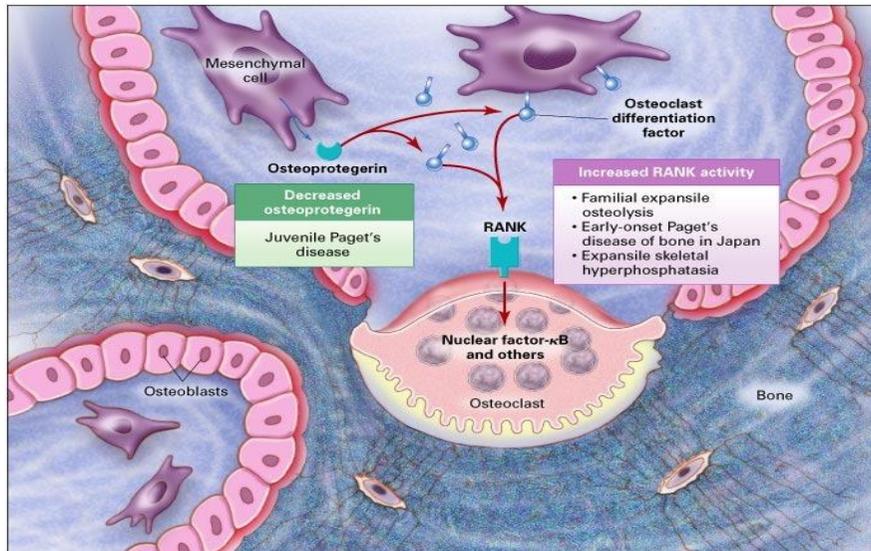


Figura 21. Osteopatías hereditarias y el sistema de señalización RANK/RANKL/OPG/NF-κB. [Adaptado de Whyte MP et al, 2002]²⁹⁵

1.3.1. Gen *TNFRSF11B* y proteína OPG en la enfermedad ósea de Paget

El gen *TNFRSF11B*, codifica la síntesis de la osteoprotegerina (OPG), regulador clave en la formación de osteoclastos y en la resorción ósea osteoclástica. Se encuentra localizado en el cromosoma 8 q24.12, constituido por 5 exones que codifican un transcrito (2345pb), a partir del cual se sintetizará una glicoproteína de 401 aminoácidos. OPG es un miembro de la superfamilia de receptores TNF, que carece de dominio transmembrana por lo que es soluble y será secretada al exterior de la célula osteoblástica, actuando como un receptor señuelo soluble para RANKL al que se une competitivamente, inhibiendo así la osteoclastogénesis, siendo su función fundamental^{87,281}. La OPG previene la unión de RANKL a RANK en osteoclastos y por ende, inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos^{85,87,289}. Reflejando este hecho, los ratones con la sobreexpresión de OPG desarrollan osteopetrosis debido al fallo en la formación de osteoclastos mientras que los ratones knockout para la OPG (OPG inactiva) desarrolla osteoporosis y fracturas, causado por un aumento del

recambio óseo. Numerosos estudios han demostrado la importancia de este gen en el remodelado óseo y su implicación en la EOP. Estudios *in vivo* con modelos animales tratados con OPG han demostrado una marcada supresión de la resorción ósea y un aumento del hueso cortical y esponjoso^{96,291}. Por el contrario, la existencia de mutaciones en regiones codificantes del gen *TNFRSF11B*, ocasiona la pérdida de función de dicha proteína. Dicha disfunción de la proteína OPG se ha descrito asociado a la Enfermedad ósea de Paget Juvenil (JPD), también conocida como Hiperfosfatasa idiopática o familiar, hiperfosfataseemia congénita o idiopática, hiperfosfatasa hereditaria o hiperostosis cortical deformante juvenil^{281,282}. La forma juvenil de la enfermedad ósea de Paget es diferente a la del adulto. El defecto se localiza en el cromosoma 8q24, ocasionado por mutaciones recesivas que acontecen una pérdida de función o deleciones del gen *TNFRSF11B*. Como consecuencia de este defecto, la síntesis de OPG es deficiente. Bajo condiciones normales, la OPG inhibe la diferenciación del osteoclasto y de esta manera la resorción y remodelación ósea. Esta entidad presenta una herencia autosómica recesiva con una prevalencia de <1 / 1.000.000 habitantes¹¹⁹, se caracteriza por un alta tasa de recambio óseo con aumento de la resorción y formación ósea, resultando un aumento del hueso cortical y trabecular, asociando una elevación persistente de fosfatasa alcalina sérica. Se presenta en la infancia ocasionando deformidades óseas generalizadas y progresivas con dolor, déficit en el desarrollo con estatura baja, aumento progresivo del perímetro craneal, deformidad de huesos largos, dificultad en deambular, *pectus carinatum* (“pecho de paloma”), debilidad muscular y pérdida temprana de la dentición. Puede observarse retinopatía y ceguera, cólicos renales recurrentes debido a la presencia de nefrolitiasis, así como calcificaciones vasculares generalizadas. Como complicaciones de esta entidad se encuentra el desarrollo de fracturas patológicas, alteraciones de la estática con cifoescoliosis y protrusión acetabular, sordera neurosensorial a consecuencia del crecimiento anómalo de los huesos del cráneo, osteoporosis y retraso en el desarrollo motor^{2,281,291,160}. La primera descripción clínica de la JPD es realizada por Bakwin y Eiger²⁹⁴, y posteriormente Whyte²⁹⁵ identifican una delección homocigótica de 100 kb que afectaba al gen *TNFRSF11B* en dos pacientes navajos, causando déficit de OPG con concentraciones circulantes séricas indetectables y por ende el origen de esta entidad JPD. Posteriormente, Cundy y colaboradores²⁸², describieron una familia de origen iraquí, en la que tres de nueve hermanos presentaban JPD, identificando una

deleción homocigótica de 3 pb en los pacientes afectados, probablemente por la pérdida de un residuo de aspartato que está altamente conservado en este gen²⁸². Hasta la fecha, se han identificado diferentes mutaciones homocigotas que afectan a regiones codificantes del gen *TNFRSF11B* en diferentes familias afectas de JPD (tabla 3)^{295,297,320-323}, que ocasionan una deficiencia o ausencia de la OPG funcional, es decir, la inactivación completa de la proteína y por ende una activación sin contraregulación de la señalización de RANK en los huesos y en otros tejidos, como el sistema cardiovascular. En los diferentes estudios genéticos realizados, y en base a la correlación genotipo-fenotipo, se observó que las mutaciones que afectaban al dominio rico en residuos de cisteína localizado en el extremo N-terminal de la proteína, causan la interrupción en la región de unión al RANKL, presentando un fenotipo más grave²⁹⁷. En cambio, las mutaciones de inserción o deleción localizadas en el extremo C-terminal presentarán un fenotipo leve²⁹⁷. En relación al estudio funcional, se identificó que la deleción de un residuo de arginina en el codón 162, alteraba la unión a RANKL y demostró que afectaba también a la glicosilación de la proteína OPG causando una acumulación anormal de dicha proteína en el interior celular²⁹⁸. Posteriormente y analizando el efecto de estas mutaciones del gen *TNFRSF11B* en JPD, plantearon la posibilidad de evaluar si variantes génicas en este locus podrían predisponer a la EOP clásica, pero los estudios genéticos realizados no mostraron resultados positivos, es decir, no se identificaron mutaciones asociadas, por los que fue excluido este gen como causa de EOP clásica^{154,283, 286,287}. A pesar de estos hallazgos, diferentes polimorfismos del gen *TNFRSF11B*^{286,299,300}, se han descrito asociados con la EOP clásica. Un estudio de casos y controles de pacientes con EOP, en la población belga, mostró una asociación entre un polimorfismo C505T localizado en el intrón 2 del gen *TNFRSF11B* y EOP esporádico²⁸⁶. También se ha descrito una asociación alélica entre un marcador de microsatélite cercano a *TNFRSF11B* y EOP. Posteriormente, se llevo a cabo en la población inglesa, un estudio caso-control, con 312 pacientes afectados de EOP y 378 controles, así como un estudio genético de transmisión familiar, de 66 familias con EOP y 140 descendientes, donde se observó una asociación significativa del polimorfismo G1181C con la población afecta de EOP. Esta variante G1181C asociada, predice un cambio de aminoácido de lisina por asparagina en el codón 3 del exón 1 del gen *TNFRSF11B*³⁰¹. Se encontró una mayor prevalencia del alelo “G” en la posición 1181 en los pacientes afectados de EOP esporádico y familiar en comparación con controles

(Odds Ratio: 1,55 (CI95%: 1,11–2,16)), también se observó una mayor frecuencia de transmisión en los pacientes afectos dentro de las familias, sin encontrarse asociado a la mutación del gen *SQSM1*. Posteriormente estos hallazgos fueron confirmados en una cohorte holandesa y otra belga, mostrando mayor significación en la asociación de este polimorfismo con los pacientes afectos de EOP, únicamente en la población de mujeres³⁰².

En los dos estudios de asociación de genoma completo (GWAS) que se han realizado en la población afecta de EOP, no evidenciaron asociaciones significativas entre variantes génicas de este gen y la población de estudio^{161,162} aunque no se llevó a cabo un subanálisis en función del género. Por consiguiente en la actualidad, es incierta la posible asociación del gen *TNFRSF11B* con la población EOP clásica.

Tabla 3. Enfermedades hereditarias del metabolismo óseo causadas por mutaciones en los genes *RANKL*, *RANK* y *OPG*.

Gen	Mutación	Patología	Referencia
<i>TNFRSF11A</i> RANK	Duplicación 18pb en la posición 84 (exon1) (84dup18)	Osteolisis expansiva familiar	Hughes AE et al, (2000) ¹⁵⁴
	Duplicación 27pb en la posición 75 (exón 1) (75dup27)	Paget de inicio temprano	Hughes AE et al, (2000) ¹⁵⁴
	Duplicación 15pb en la posición 84 (exón 1) (84dup15)	Hiperfosfatasa expansiva esquelética	Whyte MP, et al. (2002) ²⁸⁴
	Duplicación 15pb en la posición 87 (exón 1) (87dup15)	EOP juvenil	Whyte MP, et al. (2014) ³¹⁵
	Duplicación 12pb en la posición 90 (exón 1)(90dup12)	Panostótica expansiva ósea	Schafer AL, et al. (2014) ³¹⁶
<i>TNFRSF11</i> RANKL	Delección de aminoácidos (145-177)	Osteopetrosis autosómica recesiva	Sobacchi C, et al, (2007) ³⁰³
	Cambio de nucleótido (596T-A) exón 8 ambos alelos	Osteopetrosis autosómica recesiva	
	Delección de 2 nucleotidos828_829delCG	Osteopetrosis autosómica recesiva	
<i>TNFRSF11B</i> OPG	Delección de 100pb (OPG inactiva)	Enfermedad Paget juvenil (fenotipo severo)	Whyte MP, et al (2002) ²⁹⁵
	Delección de 20pb en el exón 3	Enfermedad Paget juvenil(fenotipo severo)	Chong B, et al (2002) ²⁹⁷
	Inserción CTCG en el exón 1 (proteína truncada)	Enfermedad Paget juvenil(fenotipo severo)	Grasemann C et al, (2017) ³²⁰
	Delección intragénica de 250pb (exón 1)	Enfermedad Paget juvenil(fenotipo severo)	Naot et al, (2014) ³²¹
	InserciónTT/delecciónTGA (exón 5)	Enfermedad Paget juvenil(fenotipo moderado)	Chong B, et al (2002) ²⁹⁷ Whyte MP, et al (2007) ³²² Janssens K et al, (2005) ³²³

1.3.2. Gen *TNFRSF11* y proteína RANKL en la enfermedad ósea de Paget

El gen *TNFRSF11* (miembro 11 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral) o *OPG ligando* es un gen de 45Kb localizado en el cromosoma 13q14. Codifica a la proteína RANKL, una proteína transmembrana de tipo II, que contiene 317 aminoácidos expresada a partir de un transcrito de 2195 pb que incluye 5 exones. Se expresa principalmente en los osteoblastos, células estromales de la médula ósea y en los ganglios linfáticos²⁸⁰. Esta proteína participa en la activación de la osteoclastogénesis por su unión a RANK en los pre-osteoclastos, así como en la actividad de los osteoclastos y en su supervivencia. Un aumento de la producción de RANKL por las células de estirpe osteoblásticas conduce a la diferenciación, activación y supervivencia de osteoclastos, lo que da como resultado un aumento de la resorción ósea. Los ratones Knockout para RANKL padecen osteopetrosis grave²⁸⁰.

Las mutaciones localizadas en el gen *TNFRSF11* se han asociado a la osteopetrosis autosómica recesiva, donde se objetiva en el estudio histomorfométrico ausencia de osteoclastos con disfunción del remodelado óseo. En el estudio genético se han identificado tres mutaciones diferentes (deleción de los aminoácidos 145-177, un cambio de nucleótidos (596T-A) en el exón 8 en ambos alelos, deleción de dos nucleótidos (828_829delCG)), que causarían la pérdida de las cadenas β F, β G y β H de RANKL, ocasionando alteraciones en la trimerización de esta proteína, impidiendo así la activación de la osteoclastogénesis³⁰³.

A pesar de su implicación y su importancia en la ruta de señalización RANKL/RANK/OPG, como regulador fisiológico del remodelado óseo, a día de hoy no se han identificado mutaciones ni polimorfismos que favorezcan el desarrollo de la EOP clásica.

1.3.3. Gen *TNFRSF11A* y proteína RANK en la enfermedad ósea de Paget

El gen *TNFRSF11A* (Miembro 11 A de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Este nombre refleja la homología entre el gen y el dominio extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral), se encuentra situado en el cromosoma 18q22.1 y codifica la síntesis de la proteína RANK, una glicoproteína transmembrana de tipo I, de 616 aminoácidos, expresada a partir de transcrito de 4521 pb compuesto por 10 exones. Esta glicoproteína se divide en un dominio extracelular

N-terminal de 184 aminoácidos, un péptido señal de 28 aminoácidos y un dominio transmembrana de 21 aminoácidos, que contiene cuatro pseudo-repeticiones ricas en cisteína, dos sitios de N-glicosilación y un dominio largo C-terminal citoplasmático³⁰⁴. RANK juega un papel esencial en la diferenciación de los osteoclastos y en su supervivencia y por ende, en la resorción ósea^{188,280}. La expresión de RANK se ha encontrado en la superficie de una amplia variedad de células tales como²⁸⁰; precursores de osteoclasto (monocitos circulantes)³⁰⁶, osteoclastos maduros³⁰⁷, células dendríticas³⁰⁴, células epiteliales de la glándula mamaria³⁰⁸, células de cáncer de mama³⁰⁹ y células de cáncer de próstata³¹⁰. Los modelos animales han demostrado el papel crucial de RANK en el remodelado óseo. Los ratones Knockout para RANK mostraban una osteopetrosis severa, una deficiencia esplénica de células B y ausencia de la mayoría de ganglios linfáticos³⁰⁵. En otro estudio, los ratones Knockout para RANK, carecían de osteoclastos, mostrando un grave defecto en la resorción ósea^{188,280}. De igual manera que acontece en el caso de las disrupciones en RANKL, en el caso de los ratones Knockout para RANK se observa una osteopetrosis grave por una falta de osteoclastogénesis²⁸⁰.

El gen *TNFRSF11A* fue inicialmente implicado en la patogenia de la EOP mediante estudios genéticos de ligamiento, en base a la descripción de varios trastornos óseos hereditarios que presentaban una superposición fenotípica con la EOP clásica, a pesar que la edad de inicio era más temprana y presentaban más severidad en el fenotipo²⁸¹. Estos trastornos se caracterizan clínicamente por una sordera de aparición temprana, pérdida prematura de dientes y lesiones óseas expansivas que afectan predominantemente al esqueleto axial³¹¹. Están causadas por mutaciones de inserción de entre 12 a 27 pb en el exón 1 del gen *TNFRSF11A* (tabla 4)²⁸¹. La evidencia actual sugiere que estas mutaciones inhiben o previenen la escisión del péptido señal de la proteína RANK provocando que la proteína anormal se acumule en el retículo endoplasmático, lo que a su vez provoca la activación de la señalización NF-κB a través de la respuesta UPR (Unfolded Protein Response- respuesta al estrés celular a proteínas malplegadas) (figura 22)²⁸¹. Existe una considerable heterogeneidad en el fenotipo clínico en sujetos con diferentes mutaciones de inserción y en aquellos que presentan la misma mutación tanto entre familias como dentro de ellas²⁸¹.

La primera entidad que se describió fue el síndrome de osteólisis expansiva familiar (FEO), es un trastorno óseo poco común, con herencia autosómica dominante que se

caracteriza por lesiones óseas similares a la EOP que predominantemente afectan al esqueleto apendicular asociado a características clínicas que incluyen pérdida precoz de la dentición y aparición temprana de sordera. En 1994, se localizó el gen causal de FEO en el locus *TNFRSF11A* en el cromosoma 18q21³¹² y algunos casos de EOP familiar también se relacionaron con la misma región¹⁵³. En el estudio genético se identificó una mutación que consistía en una duplicación de 18 pb en la posición 84, en el exón 1 del gen *TNFRSF11A* que afecta a la proteína RANK como la causa de FEO¹⁵⁴ y también se observó una duplicación similar de 27 pb en la posición 75, en el péptido RANK como la causa de la EOP familiar de inicio temprano^{154,155}. Posteriormente, se localizó una duplicación de 15 pb en la posición 84 en la región de RANK como causa de otra entidad denominada Hiperfosfatasa expansiva esquelética (ESH)²⁸⁴, con unas características clínicas que se superponían en cierta medida con las de FEO y EOP familiar de inicio temprano^{284,314}. Asimismo, se han identificado dos nuevas mutaciones de inserción en el gen *TNFRSF11A*, que corresponden a dos entidades como; la enfermedad de Paget juvenil, en una paciente a la edad de 2 años, que mostraba una mutación de inserción heterocigótica de 15 pb en la posición 87 en el exón 1 del gen *TNFRSF11A* (87dup15)³¹⁵. A pesar que la mutación es del mismo tamaño que la mutación de 15 pb que causa FEO, el cambio de secuencia es ligeramente diferente al igual que el sitio de inserción. La otra entidad identificada es la enfermedad panostótica expansiva ósea, causada por una duplicación de 12 pb en la posición 90 (90dup12) en *TNFRSF11A* que afecta al péptido señal de RANK, al igual que ocurre en las otras mutaciones³¹⁶. Las diferencias fenotípicas de estos trastornos óseos hereditarios con una herencia autosómica dominante que afectan al gen *TNFRSF11A*, se describen en la tabla 4²⁸¹. De esta manera, el gen *TNFRSF11A* tiene una importancia especial en el remodelado óseo, ya que determina la diferenciación de los osteoclastos y su supervivencia²⁸⁰, así como su localización genética, por lo que ha sido identificado como una región candidata de susceptibilidad de EOP. Por estos motivos, la atención se centró en la posibilidad que el gen *TNFRSF11A* pudiera contribuir al desarrollo de la EOP clásica, sin embargo, en un primer momento, los diferentes estudios de asociación no lograron detectar mutaciones ni en los intrones ni exones de *TNFRSF11A* en la población afecta de EOP clásica^{283,286}, a pesar que la región del exón 1 del cromosoma 18q22 se había relacionado con la EOP en algunas familias¹¹⁰. Sin embargo, cabe señalar que estos estudios de asociación se realizaron con un tamaño muestral limitado,

dificultando la probabilidad de mostrar resultados positivos, pero posteriormente se han observado asociaciones con diferentes polimorfismos del gen *TNFRSF11A* y EOP clásica, al igual que, se ha confirmado su asociación tras los resultados obtenidos en los dos estudios de asociación de genoma completo, sugiriendo que polimorfismos o variantes genéticas en el gen *TNFRSF11A* predisponen a EOP^{161,162,166,317}.

De acuerdo con los resultados del estudio genético realizado en tres poblaciones del norte de Europa (Bélgica, Holanda, Inglaterra)³¹⁷ de casos esporádicos de EOP sin presencia de mutación *SQSTM1* asociada ni historia familiar confirmada, mostraron una distribución diferente de dos polimorfismos no sinónimos del gen *TNFRSF11A* p.V192A (rs1805034, c.T575C, en el exón 6) y p.H141Y (rs35211496, c.C421T, en el exón 4) en pacientes con EOP en comparación con la población control, identificándose un cambio de valina a alanina en el codón 192 (V192A) y un cambio de histidina a tirosina en el codón 141 (H141Y). En los estudio de conservación inter-especie de diversos organismos, se observó que p.H141 y p.V192 son aminoácidos conservados evolutivamente en mamíferos, lo que sugiere una implicación importante en la función de RANK. El mayor efecto se encontró para la variante c.T575C (p.V192A), con un riesgo 1,3 veces mayor en presencia del alelo "C" (p.A192), presentando mayor significación en la población femenina. Sin existir correlación fenotipo-genotipo en ambos polimorfismos con la clínica de EOP en el momento del diagnóstico. Tampoco se asoció a una mayor severidad en el fenotipo ni a una menor edad al diagnóstico. En el estudio funcional realizado, no se encontraron diferencias significativas entre los alelos de este SNP en relación a la activación del NF- κ B.³¹⁷

Posteriormente, se realizó un estudio de asociación genética en una población italiana¹⁶⁶ de 654 EOP esporádico y 496 controles, replicando en esta población, los resultados obtenidos en el estudio europeo previo³¹⁷. Estos dos polimorfismos se asociaron con una mayor susceptibilidad a desarrollar EOP, y además, con una mayor severidad en el fenotipo. El mayor efecto se observó para la variante V192A, el ser portador del alelo "C", aumentaba el riesgo un 29% de presentar EOP, y este riesgo era mayor, un 71% si se asociaba a la presencia de mutación p.P392L en el gen *SQSTM1*. También se constató que a pesar de aumentar el riesgo de desarrollar EOP, los portadores del alelo "C" presentaban mayor severidad al diagnóstico con mayor afectación poliostótica y mayor número de localizaciones afectas al diagnóstico. Asimismo, también se observó que la asociación de la mutación de *SQSTM1* en los

pacientes portadores del alelo “C”, presentaban mayor riesgo de presentar mayor extensión de la enfermedad al diagnóstico comparando con los pacientes sin mutación *SQSMT1* asociada. Análisis que no se pudo determinar en el estudio anterior³¹⁷, dado que en la selección de la población de estudio, la mutación *SQSMT1* debía de ser negativa. Asimismo, en el estudio funcional, se observó que la variante TNFRSF11A A192 (rs1805034) estaba asociada a una mayor actividad de NF- κ B in vitro, incluso en ausencia de la mutación *SQSMT1*, lo que confirma las evidencias genéticas y clínicas. Estos dos polimorfismos no sinónimos (rs1805034, rs35211496) se encuentran en regiones codificantes del gen, en la región extracelular de RANK (residuos 30-194), en el dominio de pseudorrepetición rico en cisteína (CDR), la variante V192A en el CDR4 (residuos 155-197) y la variante H141Y en el CDR3. Estos dominios CDR son característicos de los miembros de la familia TNFRSF³¹⁸, y son cruciales en la interacción entre el ligando y receptor, es decir, para presentar una alta afinidad entre RANKL y RANK (sobre todo depende de la CDR2 y CDR3). La región CDR4 es importante para mantener la integridad estructural del receptor, por lo que mutaciones dentro de esta región se han asociado con cambios conformacionales locales y funcionales con implicaciones en la osteoclastogénesis³¹⁹. Por lo tanto, estos polimorfismos presentan un efecto de deletéreo sobre el funcionamiento de la proteína RANK, aconteciendo una hiperactivación de la señalización NF- κ B, con efecto sobre la actividad y supervivencia de los osteoclastos.

En relación al estudio de asociación de genoma completo (GWAS) realizado en la población EOP *SQSMT1* negativo se identificó una asociación entre dos SNP (rs2957128 y rs3018362) próximos al gen TNFRSF11A y EOP¹⁶². Estos dos SNP localizados fuera del gen *TNFRSF11A*, en la región 3'-UTR (8467 y 29826 pb de TGA), se encontraban en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs1805034 (T575C), por lo que se analizaron en la población italiana¹⁶⁶, sin mostrar asociación con la población afectada de EOP del estudio ($p=0,47$ y $p=0,58$, para rs2957128 y rs3018362, respectivamente), ni tampoco en la población EOP *SQSMT1* positiva del estudio¹⁶⁶.

Tabla 4. Fenotipos de los síndromes hereditarios asociados con las diferentes mutaciones de inserción en el exón 1 del gen TNFRSF11A. [Adaptado de Ralston SH, 2019]²⁸¹

Síndrome	Osteólisis expansiva familiar (FEO)	EOP familiar de inicio precoz (Japón)	Paget juvenil	Hiperfosfatasia expansiva esquelética (ESH)	Panostótica expansiva ósea
Mutación	84dup18	75dup27	87dup15	84dup15	90dup12
Deformidad ósea	Si	Si	Si	Si	Si
Sordera en la infancia	Si	Si	Si	Si	Si
Perdida prematura de la dentición	Si	Si	Si	Si	Si
Hipercalcemia	No	Si	No	Si	No
Fracturas patológicas	Si	Si	Si	No	Si
Inicio de la enfermedad	Infancia	Adolescencia	Primera Infancia	Adolescencia	Primera Infancia
Patrón de afectación					
Craneal	+	+	+	-	+
Huesos faciales	+	++	+	-	+
Columna vertebral	-	++	-	+	+
Escápula/clavícula	-	+	-	+	+
Pelvis	-	++	+	+	+
Fémur	++	++	+	+	+
Tibia/peroné	++	+	+	+	+
Húmero	+	+	-	+	+
Radio/Cúbito	++	+	+	++	+
Carpo/Tarso	-	+	-	+	+
Falanges	-	+	+	++	+

La frecuencia de afectación está indicada por: rara vez / nunca involucrada (-), a veces involucrada (+), a menudo involucrada (++)

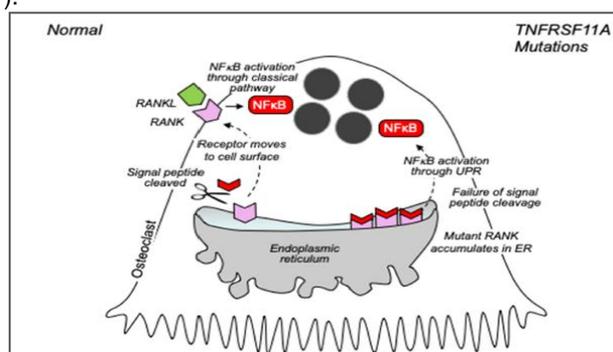


Figura 22. Fisiopatología de los síndromes hereditarios asociados a las mutaciones de inserción en el exón 1 del gen TNFRSF11A. [Adaptado de Ralston SH, 2019]²⁸¹

En condiciones normales, el péptido señal RANK se escinde a medida que emerge del retículo endoplasmático (RE) y el receptor migra a la superficie celular donde puede ser activado por RANKL provocando la activación de NF-κB a través de la vía clásica (lado izquierdo de la figura). Las mutaciones de inserción que afectan al péptido señal de RANK dan como resultado una fallo en la escisión del péptido señal, lo que hace que la proteína anormal se acumule en el RE con activación de NF-κB a través de la respuesta UPR (respuesta de proteína desplegada) (lado derecho de la figura).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La enfermedad ósea de Paget se caracteriza por ser un trastorno crónico y focal del remodelado óseo con una resorción incrementada seguida de una formación osteoblástica de igual intensidad aunque desorganizada y anárquica, que va a dar lugar a variaciones del tamaño, densidad y consistencia de los huesos afectos así como una resistencia disminuida, ocasionando alteraciones biomecánicas del mismo, lo que facilita la aparición de un hueso más frágil susceptible a presentar diversas complicaciones como deformidades óseas, sordera, artropatía por vecindad y fracturas, causando dolor, deterioro de la capacidad funcional y de la calidad de vida.

La EOP presenta una gran variabilidad en su distribución en función de la edad, género, etnia y área geográfica, a pesar que ha sido descrita en casi todos los continentes, se ha observado que su prevalencia y su distribución geográfica es heterogénea, con grandes diferencias entre regiones vecinas. Es una enfermedad que afecta principalmente a pacientes de ascendencia británica, siendo común en Inglaterra, Australia, Nueva Zelanda o Norteamérica. España muestra una prevalencia intermedia alrededor de 1,21% en la población mayor de 55 años. Además esta entidad presenta una distribución peculiar con diferencias muy marcadas entre regiones vecinas, apareciendo zonas donde existe una acumulación significativa de casos o focos de alta prevalencia. En España existen dos focos de alta prevalencia, son zonas geográficas de ámbito rural con gran aislamiento geográfico y marcada endogamia, como son: Sierra de la Cabrera en la provincia de Madrid y la comarca de Vitigudino en la provincia de Salamanca.

Los estudios epidemiológicos realizados en las últimas cuatro décadas, sugieren que la prevalencia, incidencia y la severidad de la EOP están disminuyendo en la mayor parte de las regiones estudiadas, siendo más significativo este descenso de prevalencia e incidencia en el Reino Unido, Nueva Zelanda y en diferentes ciudades Europeas. Su frecuencia parece estar disminuyendo de forma más marcada en las regiones conocidas como de alta prevalencia, pero no ocurre lo mismo en todas las zonas analizadas. En España, concretamente en la región de Vitigudino (Salamanca), foco de alta prevalencia de esta entidad, se ha observado una disminución de su prevalencia en

el periodo comprendido entre 2004 y 2009, no observándose esta tendencia en el resto de la provincia de Salamanca.

En cuanto a la severidad en el momento del diagnóstico, en las últimas décadas también se ha observado un descenso de la gravedad de la afección ósea al diagnóstico y de las complicaciones secundarias en diferentes países, preferentemente en aquellos con alta prevalencia de la enfermedad e incluso en España. A pesar de estas evidencias, existen datos procedentes de otras regiones con prevalencias similares a la española, que no mantienen esta misma tendencia, incluso se ha observado un aumento de gravedad clínico-biológica en el momento del diagnóstico durante los últimos años.

En la actualidad disponemos de escasos estudios epidemiológicos publicados que aporten información sobre los cambios seculares en cuanto a la incidencia, severidad, localización y edad de presentación al diagnóstico de la EOP, así como la influencia del género en dichos cambios seculares en regiones de baja prevalencia como es la nuestra. La escasa disponibilidad de publicaciones que evalúen dicha tendencia en áreas de baja prevalencia durante un largo periodo de tiempo, nos motivó a plantearnos este estudio con el fin de mejorar y profundizar acerca del comportamiento clínico-epidemiológico de esta enfermedad.

Desde hace años el estudio de los factores implicados en la etiología de la EOP ha constituido un área de investigación muy activa, se han expuesto múltiples hipótesis, pero a día de hoy, este interrogante permanece sin resolver. Se considera actualmente una enfermedad compleja, multifactorial con participación de forma sinérgica de factores ambientales y genéticos. El factor de susceptibilidad genética explicaría ciertos rasgos epidemiológicos como la predisposición a desarrollarse en determinados grupos étnicos y la fuerte tendencia a la agregación familiar. Aproximadamente, entre el 15 y el 40% de los pacientes tienen una historia familiar positiva y se ha observado que el riesgo relativo de desarrollar la enfermedad ha sido estimado en siete veces superior entre los familiares de primer grado de pacientes con la enfermedad respecto a la población general, mostrando un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta que aumenta con la edad, con una alta penetrancia a partir de sexta década. Por este motivo los factores genéticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EOP. En los casos familiares, los factores genéticos pueden ser

determinantes, mientras que en los casos esporádicos los factores genéticos podrían actuar como un factor de riesgo, modulando el efecto de posibles factores ambientales. Asimismo, los factores ambientales también pueden ser determinantes en la etiopatogenia de la EOP, dado que podrían explicar diferentes observaciones acontecidas en esta enfermedad como su distribución poblacional heterogénea, el grado de penetrancia variable, su distribución esquelética focal, cuando lo esperado sería una afectación generalizada, o los cambios más recientes observados en relación a la incidencia y gravedad. Estas evidencias apoyarían su participación en el desarrollo de la enfermedad.

El gen que ha mostrado mayor susceptibilidad en la EOP es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*), que codifica la proteína p62, jugando un papel importante en la cascada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis a través de la ruta de señalización RANK/RANKL/OPG/NF- κ B. Se ha identificado que variaciones en la proteína p62 causarían un desacoplamiento en la activación de dicha ruta de señalización, traduciéndose en un gran incremento de la osteoclastogénesis, base patogénica del desarrollo de la EOP.

Las mutaciones descritas en el gen del *SQSTM1*(p62) no explicarían de forma completa la patogenia de la EOP, dado que estas mutaciones no se encuentran en la mayor parte de los pacientes, ya que se ha descrito en el 20-40% de los pacientes con antecedentes familiares y en el 5-10% de los pacientes con enfermedad esporádica. Además, las mutaciones del gen *SQSTM1*(p62) muestran una penetrancia incompleta, enfatizando el papel de factores ambientales y de otros genes modificadores, en la etiología de la enfermedad. A día de hoy, se continúa investigando la existencia de mutaciones en otros genes asociados a esta entidad, debido a la heterogeneidad genética que presenta. Los candidatos más claros son aquellos que, al igual que el gen *SQSTM1*(p62), están relacionados con la osteoclastogénesis. El sistema RANKL/RANK/OPG ha demostrado que constituye una cadena fisiológica en la determinación del balance del remodelado óseo, siendo un sistema de comunicación intercelular que regula especialmente la osteoclastogénesis. Una alteración en dicho sistema de señalización RANKL/RANK/OPG provocaría una desregulación del remodelado óseo y como consecuencia estados patológicos que afectan principalmente al remodelado óseo como en la EOP. Se han identificado mutaciones en diferentes componentes de esta vía de señalización, principalmente en los genes

TNFRSF11A(RANK) y *TNFRSF11B*(OPG) en sujetos con enfermedades óseas hereditarias caracterizadas por un aumento del recambio óseo, con características clínicas, radiológicas e histológicas similares a la EOP clásica.

Por todas estas evidencias detalladas acerca del conocimiento genético de la EOP, nos planteamos evaluar la importancia de las alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1*(p62) y determinar la existencia de variaciones polimórficas en los genes *TNFRSF11B*(OPG) y *TNFRSF11A*(RANK) en la EOP tanto familiar como esporádica en nuestra población de baja prevalencia, con el fin de valorar su impacto en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, así como su influencia en el fenotipo de la EOP.

Por consiguiente, y con la finalidad de investigar y mejorar nuestro conocimiento acerca tanto del patrón de comportamiento clínico-epidemiológico como genético de la EOP de nuestra población de baja prevalencia, y con la intención de identificar nuevos factores independientes predictivos de severidad que nos condicionen mayores complicaciones en el curso de la misma, nos planteamos los siguientes objetivos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la existencia de cambios seculares en la incidencia y en la severidad en el momento del diagnóstico de la EOP, en un área de baja prevalencia entre 1970 y 2009, así como analizar la importancia de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (p62) y la presencia de variaciones alélicas en los genes *TNFRSF11B* (OPG) y *TNFRSF11A* (RANK), tanto en la susceptibilidad para el desarrollo de la EOP como la influencia en su fenotipo.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la presencia de cambios en la evolución del porcentaje de nuevos diagnósticos durante el período de estudio, comprendido entre 1970 y 2009, en relación a la población de riesgo de Barcelona, siendo un área de baja prevalencia. Evaluar la influencia del género en dichos cambios seculares.
2. Describir en los pacientes afectos de EOP diferencias en cuanto a la severidad en el momento del diagnóstico, evaluada por la extensión y la actividad de la enfermedad y correlacionarlas con el año del diagnóstico, año del nacimiento y edad al diagnóstico. Asimismo, detallar variaciones en la edad de presentación, en la distribución anatómica de las lesiones óseas al diagnóstico y en las complicaciones clínicas acaecidas durante el período de estudio. Evaluar la influencia del género en dichos cambios seculares.
3. Determinar la existencia de factores independientes predictivos de severidad en el momento del diagnóstico que nos condicionen mayores complicaciones en el curso de la enfermedad.
4. Analizar la importancia de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (p62) y la presencia de variantes polimórficas de los genes *TNFRSF11B* (OPG) y *TNFRSF11A* (RANK) implicados en la osteoclastogénesis, en la susceptibilidad para el desarrollo de la EOP, así como evaluar la correlación genotipo-fenotipo en nuestra población de EOP.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. Estudio clínico y epidemiológico de la EOP en nuestra área de baja prevalencia

4.1.1 Diseño del estudio y área de referencia

Estudio descriptivo ambispectivo observacional de pacientes procedentes de la consulta monográfica de EOP del servicio de reumatología del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, con un área media de referencia poblacional de 460.575 ± 43.707 habitantes, según el censo del año 2010, siendo el 28% de la población total de Barcelona.

Los distritos que componen nuestra área hospitalaria y la población que atienden, se describen a continuación: El distrito de San Martí con 228.701 individuos, representa un 14,1% del total poblacional de Barcelona, a continuación con un 7,6% del computo global se encuentra el distrito de Gràcia con 123.383 individuos, y por último, Ciutat Vella con 107.426 individuos, estima un 6,6% del total³²⁷ (figura.23).

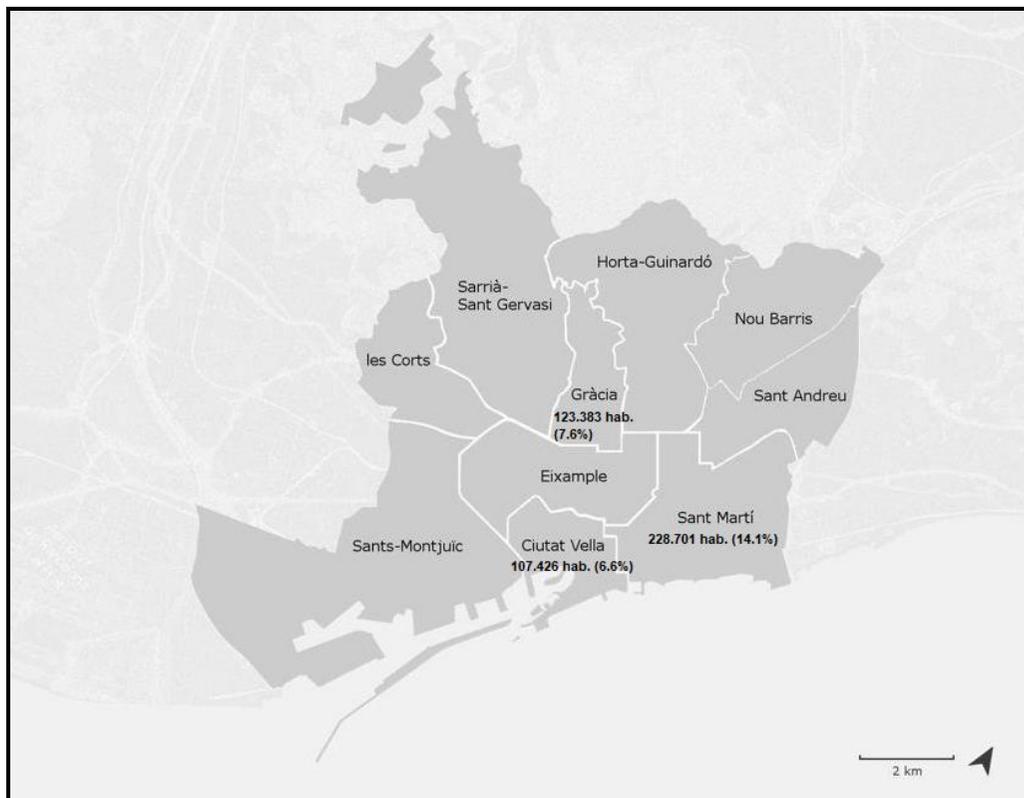


Figura 23. Área de referencia poblacional (*Censo de población y vivienda 2010 Instituto Nacional de Estadística. Instituto de Estadística de Cataluña*)²³⁷

4.1.2. Población de referencia

La población de referencia de Barcelona se estratificó en tres grupos edades (<45 años, 45–64 años y \geq 65 años), los dos grupos de mayor edad se consideraron la población de riesgo de EOP y se dividió el periodo de estudio correspondiente en intervalos de 7 años, creando 5 grupos de estudio (1970-1977, 1978-1985, 1986-1993, 1994-2001, 2002-2009) con el objetivo de evaluar los cambios seculares del porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP. Los datos que documentan la población de referencia de Barcelona se obtuvieron de los registros publicados por el Instituto Nacional de Estadística³⁴. En la tabla (5 y 6), se detalla la población de riesgo de Barcelona estratificada por los diferentes períodos de estudio y por los distintos grupos de edad.

Tabla 5. Población de riesgo de Barcelona durante el período de estudio (3 distritos del área metropolitana de Barcelona, perteneciente al área del Hospital del Mar- Parc de Saut Mar)

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2002-2009
Ciutat Vella	177.544 (10,2%)	117.768 (6,7%)	90.612 (5,5%)	88.793 (5,9%)	107.426 (6,6%)
Gràcia	137.044 (7,9%)	138.253 (7,9%)	128.608 (7,8)	114.018 (7,6%)	123.383 (7,6%)
Sant Martí	209.256 (12%)	220817 (12,6%)	214.252 (13%)	206.401 (13,7)	228.701 (14,1%)
Total (área de referencia)	523.844 (30,1%)	476.838 (27,2%)	433.472 (26,3)	409.212 (27,2%)	459.510 (28,3%)
BARCELONA	1.745.142	1.752.627	1.643.542	1.505.325	1.621.537

En la siguiente tabla 6 se expresan los datos de la población de referencia durante el período del estudio 1970-2009, estratificado por los diferentes grupos de edad (<45, 45-64, \geq 65).

Tabla 6. Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según los grupos de edad.

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2002-2009
Edad					
<45	331.261 (63%)	283.666 (59%)	241.906 (56%)	222.591 (55%)	268.260 (58%)
45-64	130.686 (25%)	127.629 (26%)	108.470 (25%)	96.512 (24%)	110.910 (24%)
≥ 65	67.603 (12%)	73345 (15%)	83.096 (19%)	88.452 (21%)	86.628 (18%)
Total	529.550 (30,1%)	484.640 (27,2%)	433.472 (26,3)	407.555 (27,2%)	465.798 (28,3%)

En la tabla 6 podemos observar los cambios seculares en la población de riesgo, estratificada por los diferentes períodos del estudio y por grupos de edad. Se observa una disminución de la población de referencia entre el periodo 1970-1977 al 2002-2009, con una reducción de la población total de un 12%. Y en función de los grupos de edad: en el grupo de <45 años, existe un descenso 19%, en el grupo de 45-64 años, un descenso 15.1% y en el grupo de ≥65 años, se evidencia un aumento del 28%, constatando un envejecimiento poblacional durante el período de estudio, siendo superior este dato a otras áreas de Barcelona. En cuanto al análisis de los cambios seculares en función del género se mantuvo las mismas tendencias (tabla 7 y 8)

Tabla 7. Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según el género.

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2002-2009
Género					
Hombre	251.054	229.075	204.203	193.445	228.185
Mujer	278.496	255.565	229.269	214.110	237.613
Total	529.550	484.640	433.472	407.555	465.798

Tabla 8. Población de riesgo de Barcelona durante el periodo de estudio, estratificada según los grupos de edad y el género.

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2002-2009
Género					
Hombre					
<45	167.956	143.737	122.367	113.492	140.714
45-64	57.839	58.515	51.156	46.149	53.604
≥65	25.259	26.823	30.680	33.804	33.867
Mujer					
<45	163,305	139.929	119.539	109.099	127.546
45-64	72,847	69.114	57.314	50.363	57.306
≥65	42,344	46.522	52.416	54.648	52.761

Se incluyeron un total de 393 pacientes, diagnosticados y/o en seguimiento durante 39 años, en el período comprendido entre enero de 1970 a diciembre de 2009.

El porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP procedentes de nuestro centro se obtuvo relacionando el número de diagnósticos durante cada período de observación y ajustándolos por género y edad a la distribución de la población de referencia de Barcelona. Para obtener la estimación de los errores estándar y para calcular el intervalo de confianza del 95% de las tasas de incidencia, se calculo mediante el paquete estadístico MedCalc versión 11.3.6.0, asumiendo que el número de nuevos diagnósticos de EOP seguía una distribución de Poisson. Con el fin de comparar el porcentaje de los nuevos diagnósticos durante el período de estudio 1970-2009, se dividió el periodo de estudio correspondiente en intervalos de 7 años, creando 5 grupos de estudio (1970-1977, 1978-1985, 1986-1993, 1994-2001, 2002-2009). Para evaluar los cambios seculares tanto en los parámetros de gravedad como en las localizaciones, se compararon entre el año de nacimiento (≤ 1920 , 1921-1930, 1931-1940, 1941-1950, ≥ 1951), año de diagnóstico (1970-1977, 1978-1985, 1986-1993, 1994-2001, 2002-2009) y edad en el momento del diagnóstico (<45 años, 45-54 años, 55-64 años, 65-74 años, ≥ 75 años).

4.1.3. Población de estudio

El diagnóstico de EOP se realizó en función de una elevación de los marcadores de formación o resorción ósea, fundamentalmente un aumento de fosfatasa alcalina (FA)

asociado a una imagen radiológica y/o gammagráfica compatible con EOP en ausencia de otras enfermedades metabólicas asociadas.

4.1.4. Variables del estudio

El análisis incluyó los datos demográficos y epidemiológicos (edad al diagnóstico, sexo, año de nacimiento, año del diagnóstico, antecedentes familiares de EOP), características clínicas (manifestaciones clínicas al diagnóstico, pruebas diagnósticas realizadas), índices de actividad (índice de actividad de Renier y niveles de FA) y de extensión (índice de Coutris, índice anatómico de Renier, número de localizaciones y distribución gammagráfica (monostótico/poliostótico) de la enfermedad en el momento del diagnóstico, así como los tratamientos administrados y complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad.

El método utilizado en la cuantificación de los niveles de FA se realizó por espectrofotometría utilizando el sustrato p-nitrofenil-fosfato, con un rango de normalidad que oscila entre 40 a 129 IU/L. El rango de referencia normal de FA cambió durante el período de estudio (98-250 UI/l de 1970 a 2005 y 40-129 UI/l de 1998 a 2010). Teniendo en cuenta este hecho, hemos utilizado los múltiplos del límite superior de la normalidad para estandarizar los datos de FA en lugar de mostrar el valor de FA absoluto.

El estudio gammagráfico planar a cuerpo entero se realizó mediante el trazador ^{99m}Tc - ^{99m}Tc - hidroximetilen-difosfonato (HDP)³²⁸, que se deposita en las áreas de hueso con metabolismo aumentado. Los niveles de captación de este radiotrazador se correlacionan muy bien con la severidad de la enfermedad, siendo más sensible que la radiología simple.

Los índices utilizados en el estudio, tanto de extensión como el índice anatómico de Renier⁵², y el índice de Coutris⁵¹, así como el de actividad, el índice de actividad de Renier, se describen a continuación:

1. Índices de extensión de la enfermedad:

1.1. Índice de Coutris (1975)⁵¹:

La extensión de la enfermedad, expresada como porcentaje de esqueleto afectado, se calcula mediante el índice de Coutris, según el coeficiente que cada hueso representa en el conjunto del esqueleto, ponderado en función del porcentaje de la afección por gammagrafía ósea (hueso completo, dos tercios o un tercio). El índice oscila entre 0 (ningún hueso afectado) y 100 (todo el hueso afectado). Se representa en la tabla los coeficientes que corresponden a cada localización afectada.

Zona afectada	Coeficiente
Cara y cráneo	12
Raquis dorsal	12
Raquis lumbar	5
Sacro	5
Esternón	1
Hueso iliaco	5
Fémur	5
Tibia	4
Peroné	2
Rótula	0.5
Húmero	3
Radio	2
Cúbito	2
Clavícula	0,5
Escápula	0.5
Costillas	6
Mano	1
Pie	1

1.2. Índice anatómico de Renier (1995)⁵²:

El cálculo del grado de extensión de la enfermedad se determinó mediante el índice anatómico de Renier basado en el Coutris, el cual da como resultado el porcentaje de afectación sobre un el total del esqueleto de acuerdo a la siguiente distribución:

Localización ósea	Porcentaje
Cráneo y cara (mandíbula)	17 (21)* (2)
Sacro	2
Coxis	4,5
Fémur	9,5 (9)
Rótula, Clavícula	0,5
Tibia	5
Radio, cúbito, peroné	1
Pie	4
Escápula	2
Húmero	3,5
Mano-muñeca	2
Toda la columna	8,5 (8)*
Columna cervical	1,5**
Columna dorsal	3,7**
Columna lumbar	3,3**
Costillas	5
Esternón	0,5

* Coeficientes en mujeres.

** El porcentaje medio para una vértebra cervical es de 0,2 (0,3 para C2), 0,3 para una vértebra torácica (de 0,25 a 0,5 según la vértebra) y 0,65 para una vértebra lumbar (de 0,55 a 0,75 según la vértebra).

2. Índice de actividad:

2.1. Índice de actividad de Renier:

El cálculo de la actividad del hueso pagético se realiza mediante el índice de actividad de Renier, el cual se calcula a partir de la FA. Se considera que la FA sérica representa la suma de la correspondiente al hueso normal y al hueso pagético. Expresado según la fórmula:

$$\text{FA paciente} = [\text{FA hueso pagético} \times \text{índice de Coutris}/100 + \text{FA hueso normal} \times (100 - \text{índice de Coutris}) / 100]$$

En esta fórmula se considera que la FA del hueso sano (mediana de los valores normales) representa la actividad ósea normal (valor igual a 1); el índice de Coutris representa el porcentaje del esqueleto afectado. Conocidas el resto de incógnitas, puede deducirse el valor de FA del hueso pagético. La actividad fosfatásica representaría las veces que el hueso afectado es más activo que el normal.

Para poder calcular esta variable es necesario disponer de una fosfatasa alcalina total en el momento del diagnóstico, o al menos antes de recibir ningún tratamiento.

4.1.5. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se presentan los datos con su valor absoluto y su porcentaje para las variables cualitativas o categóricas. Las variables cuantitativas o continuas se presentan con la media y su desviación estándar o alternativamente con su mediana o cuartiles según se cumpla o no el criterio de normalidad de la variable. En el análisis bivalente se utilizó la prueba de T de student para comparar entre los grupos, los datos continuos, o el test de Anova para comparaciones de más de 2 grupos. Y para los datos cualitativos o categóricos la prueba del Chi-cuadrado o la Prueba exacta de Fisher cuando el valor mínimo esperado era inferior a 5. Se utilizó para las comparaciones entre intervalos de tiempo para los datos continuos o variables cuantitativas paramétricas, la correlación de Pearson o correlación de Spearman para las variables cuantitativas no paramétricas. Y para contrastar los datos categóricos cualitativos con variables cuantitativas se utilizó el test de Anova. El análisis de regresión logística univariado y multivariado, en base al modelo lineal generalizado: regresión de Poisson, se utilizó para evaluar los predictores de severidad en el momento del diagnóstico.

El nivel de significación estadística para todos los casos se situó en $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante paquete estadístico SPSS para Windows (versión 23).

4.2. Análisis de polimorfismos en los genes *TNFRSF11B (OPG)* y *TNFRSF11A (RANK)* y estudio molecular del gen *SQSTM1* en la enfermedad ósea de Paget.

En el estudio de asociación genética caso-control, se pretende definir la importancia de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (p62) y el papel de los polimorfismos en los genes *TNFRSF11B (OPG)* y *TNFRSF11A (RANK)* tanto en la inducción de susceptibilidad para el desarrollo de la EOP como la influencia en su fenotipo, en nuestra población caucásica española.

4.2.1. Población de estudio

Todos los pacientes incluidos en el estudio molecular procedían de los pacientes ya incluidos en el estudio clínico-epidemiológico, atendidos en la consulta monográfica de EOP del servicio de reumatología del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar.

Se incluyeron 200 pacientes con diagnóstico probado de EOP, realizado en función de los cambios típicos radiológicos, aumento de FA y estudio gammagráfico compatible con EOP. Las 200 muestras de individuos de la población control incluida, procedían del banco nacional de DNA (Salamanca), donde se encuentran muestras biológicas de referencia de la población española.

Con el objetivo de aumentar la divergencia entre los casos y controles y el poder estadístico de los resultados se seleccionaran controles hipernormales, definidos por aquellos sujetos con edad superior a 45 años (edad de riesgo para la EOP), ajustados por edad, sexo, etnia, región geográfica. Asimismo, se excluyeron todos aquellos individuos con familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) afectados de enfermedades metabólicas óseas como Paget o endocrinológicas como diabetes, hipotiroidismo o hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, enfermedad de Cushing, osteomalacia, que puedan ocasionar alteraciones en el metabolismo óseo.

4.2.2. Variables del estudio

En el estudio molecular se recogieron los datos demográficos y epidemiológicos (edad al diagnóstico, sexo, año de nacimiento, año del diagnóstico, antecedentes familiares de EOP), características clínicas (manifestaciones clínicas al diagnóstico), índices de actividad (niveles de FA) y de extensión (número de localizaciones y distribución gammagráfica (monostótico/poliostótico) de la enfermedad en el momento del diagnóstico), así como los tratamientos administrados y complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad.

4.2.3. Procedimientos de laboratorio

4.2.3.1 Análisis de polimorfismos de los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*)

Obtención y procesamiento de las muestras: A cada paciente se le extrajo 10 ml de sangre periférica por venopunción recogida en tubos con anticoagulante EDTA ya que es el anticoagulante que mejor conserva la morfología de las células sanguíneas, enviados posteriormente al IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas) y almacenado a -20°C hasta el momento de su procesamiento. La extracción del ADN de cada una de las muestras recibidas se realizó mediante la utilización del método Kit de Purificación Wizard Genomic ADN (Promega Corporation, 2014), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cuantificación de DNA mediante la tecnología (*PicoGreen*)

La concentración del DNA se determinó mediante el uso de un colorante fluorescente que se une al DNA de doble cadena (*PicoGreen*®, Molecular Probes) y su cuantificación en un fluorímetro. Para cada muestra se obtuvieron medidas para 2 diluciones seriadas y posteriormente se normalizaron las muestras a una concentración de 60ng/ul con un volumen mínimo de 20µl. Se ha demostrado que esta técnica es mucho más sensible que la medida mediante la absorbancia medida a 260 nm, permitiendo detectar hasta 25 pg/ml de DNA.

Selección de SNPs

Se realizó la selección de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, "polimorfismos de un único nucleótido"), de bloques haplotípicos intragénicos y de los SNPs marcadores ("*SNP tags*") correspondiente del gen *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*), de acuerdo con las diferentes bases de datos públicas ampliamente utilizadas, como "*International HapMap Project*" (www.hapmap.org), *ENSEMBL genome* (www.ensembl.org), *NCBI dbSNP database* (www.ncbi.nlm.nih.gov.com), *UCSC genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>).

Los SNPs se seleccionaron principalmente en función de diferentes criterios: (1) estado de validación en la población caucásica para incluir aquellos con una frecuencia del alelo minoritario (MAF)>0.1; (2) un promedio densidad de 1 SNP por 3-5 kb; (3) grado de heterocigosidad, es decir, frecuencias de alelos minoritario (MAF)> 0,05; (4) relevancia e importancia funcional, preferentemente cambios en regiones exónicas, con

una MAF publicada de >0.05 en la base de datos de ENSEMBL genome (www.ensembl.org), NCBI dbSNP database (www.ncbi.nlm.nih.gov.com); (5) dbSNP validado previamente en las distintas bases de datos públicas, teniendo en cuenta una MAF con una frecuencia superior al 1% (MAF >0,01); (6) la conservación evolutiva inter-especie de la secuencia. Al fin de establecer regiones conservadas, se compararon las secuencias genómicas de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Con la herramienta de alineamiento múltiple de la base de datos Ensembl(www.ensembl.org) se seleccionó los SNP como conservado cuando todas las especies presentaban el mismo nucleótido para el SNP dentro de la región conservada. (6) previamente asociado a EOP, con una MAF superior al 1%. Se seleccionaron los siguientes SNPs según los criterios previos determinados, en los distintos genes *TNFRSF11B (OPG)* y *TNFRSF11A (RANK)* analizados de interés. En la siguiente tabla 9 se describen los genes candidatos y los SNPs seleccionados:

Tabla 9. Los polimorfismos seleccionados de los genes *TNFRSF11B (OPG)* y *TNFRSF11A (RANK)*. Identificación de SNPs, localización, eficiencia del genotipado, frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor).

SNP ID	Chr: Posición SNP	Localización	Eficiencia del genotipado	Alelo (Minor/Major)	MAFs	HWE (p-valor)
TNFRSF11A (RANK)						
rs11152341	18:59996297	Intrón 1	95.29	G/A	0.20	0.403
rs12150741	18:59998525	Intrón 1	95.29	C/T	0.20	0.709
rs12457042	18:59993453	Intrón 1	98.76	T/A	0.06	0.089
rs4436867	18:60003644	Intrón 1	99.01	A/C	0.20	0.418
rs6567274	18:60037800	Intrón 9	98.76	T/G	0.29	0.057
rs7233197	18:59997434	Intrón 1	99.26	T/C	0.07	0.555
rs8092336	18:60036083	Exón 9	98.76	A/G	0.04	0.465
rs1805034	18:60027241	Exón 6	100	C/T	0.46	0.146
rs3018362	18:60082093	3' near gene	99.01	A/G	0.35	0.789
rs8086340	18:60006978	Intrón 1	98.76	C/G	0.47	0.318
TNFRSF11B (OPG)						
rs1032129	8:119951900	Intrón 1	96.03	C/A	0.36	0.907
rs11573869	8:119953158	Intrón 1	98.51	C/T	0.10	0.106
rs11573871	8:119952765	Intrón 1	99.01	A/G	0.11	0.534
rs1485286	8:119950668	Intrón 1	99.01	C/T	0.28	0.464
rs1564858	8:119945166	Intrón 2	98.76	A/G	0.10	0.239
rs2073617	8:119964283	5' UTR	99.26	C/T	0.49	0.332
rs2073618	8:119964052	Exón 1	99.26	G/C	0.50	0.581
rs3102735	8:119965070	5' near gene	99.01	C/T	0.15	0.584
rs3134069	8:119964988	5' near gene	99.01	C/A	0.07	0.562
rs3134070	8:119965024	5' near gene	99.01	T/A	0.07	0.562
rs6415470	8:119955111	Intrón 1	95.04	G/A	0.42	0.579

Según los datos de HapMap y el desequilibrio de ligamiento (LD) ($r^2 \geq 0,8$) de estos dos genes, los 10 tag SNPs seleccionados de RANK capturaron la variación de 31 SNP en la región, los 11 tag SNPs de OPG capturaron 41 SNP en su región.

Genotipado mediante la tecnología MassARRAY®iPLEX (Nodo Santiago de Compostela)

El genotipado de los 21 SNPs seleccionados se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) en el nodo de Santiago de Compostela mediante tecnología MassARRAY®iPLEX Gold (Sequenom®, San Diego, EE.UU.) utilizando los protocolos y programas informáticos recomendados por Sequenom®.

La tecnología de MassARRAY® iPLEX Gold (Sequenom, San Diego, EE.UU.) deriva de la conocida como ensayo MassEXTEND homogéneo, en el que el oligonucleótido MassEXTEND se une a un sitio adyacente al polimorfismo de interés y mediante una reacción de PCR, se produce la elongación del oligonucleótido sobre el SNP. El producto resultante de la extensión del oligonucleótido, entre 1 y 4 bases más largo que el primer original, se analiza por espectrometría de masas MALDI-TOF (*“desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo”*) y es empleado para determinar la secuencia de nucleótidos en el sitio polimórfico en un proceso de minisequenciación.

La reacción de iPLEX Gold es un método universal para la detección de inserciones, deleciones, sustituciones y otros polimorfismos en el ADN amplificado. La tecnología iPLEX Gold de Sequenom está diseñada para el genotipado de un número elevado de muestras, en placas de 96 y 384 pocillos, y la transferencia de muestras y reactivos está robotizada. Las reacciones para el procesamiento de las muestras se llevan a cabo en termocicladores duales de 384 pocillos, lo que permite un alto grado de multiplexado.

La tecnología de MassArray (Sequenom) se basa en la detección de los productos de la reacción de discriminación alélica mediante MALDI-TOF, en función de la estrategia de genotipado de iPLEX Gold. El proceso de genotipado consta de dos reacciones. En primer lugar se amplifican los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés mediante una PCR multiplex y otra de extensión de una sola base a partir de una sonda. La reacción iPLEX Gold se basa en reacción de discriminación alélica de extensión de una única base (SBE-single base extension). Debido a esto los diseños de Sequenom para cada polimorfismo consisten en un fragmento con la base a genotipar y unos 100

pares de bases a cada lado. El software de diseño de ensayos comprobará los posibles primers de PCR y las posibles sondas necesarias para genotipar el polimorfismo. Asimismo, el software descarta aquellos SNPs que no se pueden genotipar debido a las características de las regiones contiguas (bien sea por la presencia de otros SNPs, bien por la naturaleza de la secuencia que puede dificultar e incluso impedir la correcta unión de la sonda). El máximo número posible de SNPs por ensayo es 36 pero el nivel medio por ensayo depende del número total de loci y de las características de la secuencia que flanquea el SNP. En el ensayo IPLEX se realizan los siguientes pasos que se describen a continuación (figura 24)

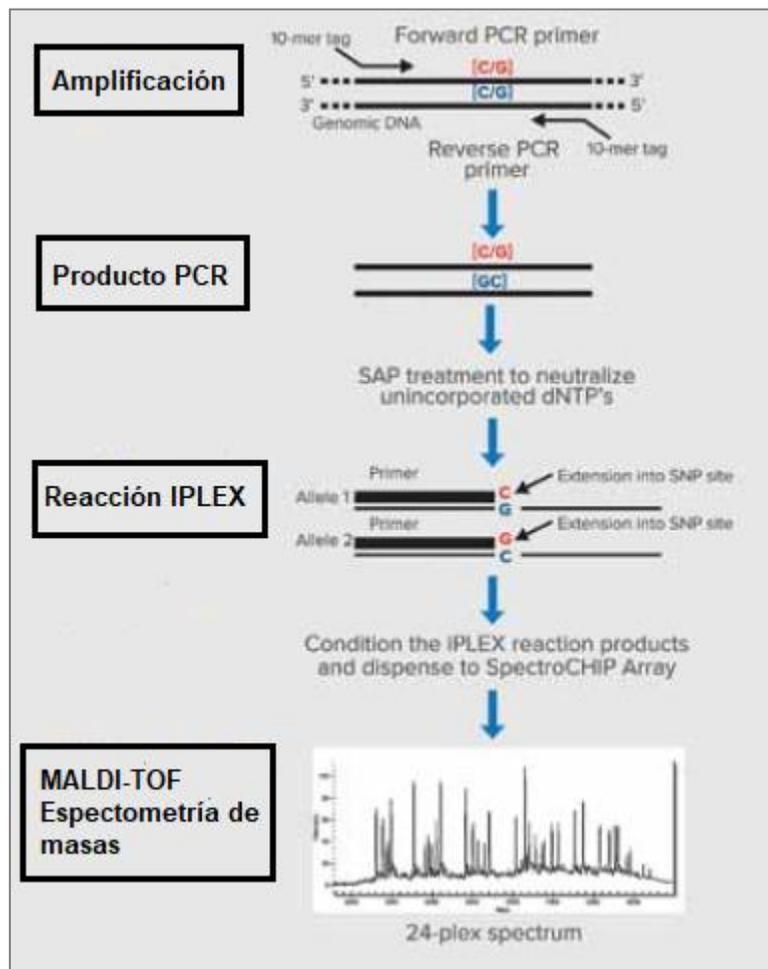


Figura 24. Descripción de los procedimientos en el genotipado de alto rendimiento mediante la tecnología de MassARRAY® iPLEX Gold.

Una vez diseñados y adquiridos los primers de PCR y los cebadores de extensión para cada SNP mediante el software de diseño, se lleva a cabo la amplificación de la región de interés en placas de microtitulación de 96 o 384 pocillos utilizando los reactivos suministrados en los kits de reactivos iPLEX. Tras la PCR se elimina el exceso de nucleótidos que no se han incorporado en la PCR mediante su defosforilación (la defosforilación de cualquier nucleótido residual de la amplificación previene su incorporación en el paso de extensión de oligonucleótidos) a través de un tratamiento enzimático con SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). A continuación se lleva a cabo la reacción iPLEX se basa en reacción de discriminación alélica de extensión de una única base (SBE-single base extensión). Este ensayo consiste en una reacción de PCR inicial específica del locus, seguida de una reacción de extensión de base única iPLEX en la que se agrega una mezcla de cebadores de extensión de oligonucleótidos, diseñados para aparearse con los fragmentos de ADN amplificados, junto con una enzima de extensión y terminadores de didesoxinucleótidos modificados en masa. En la reacción de extensión, el iniciador hibrida una base previa al locus en estudio. El genotipado de la muestra se lleva a cabo por la adición de un ddNTP al iniciador de extensión, que será complementario a la base en estudio. Este ddNTP está modificado en masa a fin de aumentar la diferencia en masa entre las diferentes secuencias extendidas. El cebador de extensión es una base más larga tras la reacción de extensión. Esta base le confiere una masa determinada, que será detectado por el espectrofotómetro MALDITOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) que registra el tiempo de vuelo (*Time OF Flight*) del producto de extensión en el interior de una columna de vacío, tiempo que asocia a una masa que, a su vez, será asociada a un genotipo.

Después se dispensa la placa de 384 pocillos en un Spectro CHIP bioarray delante el Mass ARRAY Nanodispenser (Sequenom, Inc). La diferencia en masa tras la reacción de iPLEX es detectada por medio del espectrofotómetro MALDI-TOF, permitiendo llevar a cabo el genotipado automáticamente. Posteriormente el programa de análisis Typeranalyzer v4.0.2 (Sequenom, Inc) asigna genotipos a los SNPs en cada ensayo en función de las masas obtenidas. Como control para determinar la eficacia de cada reacción de extensión se emplea el pico correspondiente a los primers que no han extendido.

4.2.3.2. Estudio molecular del gen *SQSMT1*

La secuenciación del gen *SQSMT1* de nuestra población de pacientes, se realizó mediante la secuenciación Sanger automatizada en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Valencia, utilizando los protocolos y programas informáticos recomendados por Applied Biosystems.

La secuenciación por el método de Sanger automatizado, implica una previa fragmentación del ADN a secuenciar, seguido de la amplificación de estos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático usando las condiciones de amplificación previamente determinadas. A continuación, cada fragmento acabado en didesoxinucleótido (ddNTP) se marcó con cuatro fluoróforos distintos, de manera que cada didesoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) era portador de un color de fluoróforo diferente. De este modo, se produce una "escalera" de ADN de fragmentos que difieren en una base de longitud. Para la purificación del producto de PCR se procedió a la digestión con una exonucleasa, con el objetivo de eliminar el resto de cebadores utilizados junto con los dNTPs sobrantes procedentes de la PCR y del producto amplificado. Posteriormente, los fragmentos amplificados mediante PCR y marcados con su correspondiente fluoróforo fueron separados por su tamaño mediante la electroforesis capilar en un gel de poliacrilamida con detección automatizada de los fragmentos de DNA marcados fluorescentemente, proporcionando la secuencia ordenada de los fragmentos en cromatogramas. Posteriormente, se llevo a cabo la secuenciación automática en el secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems) del Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Valencia.

El diseño de los primer o cebadores (cebador sentido y con el cebador anti-sentido) de nuestro estudio se llevó a cabo con el objetivo de asegurarnos que todas las regiones codificantes y no codificantes del gen quedaban representadas y se amplificaban correctamente. Posteriormente, tras la obtención de todas las variantes genéticas del gen mediante la secuenciación automatizada se priorizaron las variantes no sinónimas como las variantes génicas "*missense*" o "*nonsense*" para realizar el análisis del estudio de asociación genético.

4.2.4 Análisis estadístico

En el análisis descriptivo de los datos analizados se calcula la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa y las variables cuantitativas se describen en términos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). La comparación de las características clínicas entre las diferentes poblaciones analizadas se aplica distintos tests estadísticos en función de utilizar una variable cuantitativa o cualitativa. Las variables cuantitativas se evaluaron mediante la t de Student o por la U de Mann Whitney en caso de no presentar una distribución normal. En los estudios de asociación de polimorfismos y en el caso de variables clínicas cualitativas se analizó la distribución mediante el test de Chi-cuadrado con corrección de Yates en los casos de las tablas de 2x2, o el test exacto de Fisher, para valores esperados menores de 5. En aquellos casos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se realizó una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. Debido al pequeño número de muestras identificadas en los casos de EOP familiar, se llevó a cabo el estudio estadístico con pruebas no paramétricas ya que este tipo de tests proporcionan robustez a la significación obtenida. Para las comparaciones múltiples con el fin de comprobar si existe interacción entre diferentes parámetros clínicos cuantitativos se utilizó el test ANOVA en el caso de que los datos cumplieren igualdad de varianzas y siguiesen una distribución normal. En el caso de que las variables no cumplieren la igualdad de varianzas ni siguiesen una distribución normal se aplicó el test de Mann Whitney (2 muestras independientes) o el test de Kruskal-Wallis (>2 muestras independientes).

Se utilizará la correlación de Spearman para analizar la asociación entre variables cualitativas.

El nivel de significación estadística para todos los casos se estableció en $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante paquete estadístico SPSS para Windows (versión 23).

Estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipos

El estudio de desequilibrio de ligamiento y el establecimiento de los bloques haplotípicos a partir de los SNPs seleccionados se llevó a cabo mediante la herramienta Haploview y la librería haplo.stats de la herramienta R [www.r-project.org]. Se ha realizado un análisis por haplotipos en los genes o regiones cromosómicas en los que

se concentraban varios de los SNPs genotipados. El estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipo permite observar grupos de variantes dependientes entre sí, es importante su detección, ya que muchas de las propiedades exigidas a las variantes en un estudio de asociación es la independencia. Para el estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipos se partió de todas las variantes genéticas, además de las mutaciones. Posteriormente se realizó un estudio de desequilibrio de ligamiento para cada gen del estudio utilizando la información espacial.

Análisis de asociación de las distintas variantes genéticas

Las diferencias entre casos y controles de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas para cada polimorfismo o bloque haplotípico se utilizó el software R versión 2.15.0 para Windows [www.r-project.org] junto a librerías altamente especializadas en estudios de asociación genotípica, “genetics” [<http://cran.r-project.org/web/packages/genetics/index.html>] y “SNPassoc” [<http://cran.r-project.org/web/packages/SNPassoc/index.html>].

El estadístico empleado en el estudio de asociación caso-control ha sido el test Chi-cuadrado con corrección de Yates o el test exacto de Fisher, para valores esperados menores de 5. La magnitud de las asociaciones se han estimado mediante la “odds ratio” (OR), con un intervalo de confianza del 95%. Todos los análisis fueron realizados asumiendo los diferentes modelos genéticos: recesivos, dominantes, codominantes y “log additive”. Los modelos genéticos de herencia se clasifican en: “Codominante”, modelo donde el individuo expresa en su fenotipo tanto el carácter dominante como recesivo para una determinada característica; “Dominante”, modelo donde un alelo enmascara a otro; “Recesivo”, modelo donde los alelos que determinan el fenotipo necesitan estar solos para poder expresarse; “log additive”, modelo donde cada alelo multiplica el fenotipo.

Adicionalmente para explorar la epistasia o la existencia de interacciones significativas se realizó un análisis de regresión logística incluyendo cada uno de los posibles pares de SNPs, mediante la librería “SNPassoc” del software R versión 2.15.0 para Windows. El estudio de epistasia nos permite analizar las diferentes interacciones entre las distintas variables independientes en una determinada población, e identificar la modulación de una variable en el efecto de otras. El estudio de epistasia se realizó

asumiendo los diferentes modelos genéticos, considerándose la significancia estadística con un valor umbral de 0,01.

Análisis multifactorial MDR (multifactor dimensionality reduction)

Además se testarán todas las interacciones funcionales entre las diferentes variantes genéticas, es decir el efecto combinado entre los distintos SNPs mediante el sistema MDR (multifactor dimensionality reduction, www.epistasis.org) (sistema MDR- librería “multtest” software R, v 2.15.0). Este sistema se basa en un enfoque no paramétrico de datos que evalúa diferentes combinaciones de factores genéticos. Los datos se dividen en un conjunto de entrenamiento (“training set” (9/10)) y un “testing set” (1/10) para realizar una validación cruzada. Se selecciona un conjunto de n SNPs y cada combinación genotípica multilocus definida por los n SNPs se clasifica como de “alto riesgo” o “bajo riesgo” en función del ratio de casos y controles. En cada caso se selecciona el modelo con menor error de clasificación y se estima el error de predicción en el testing set.

Estudio “in silico”. Análisis funcional de las distintas variantes genéticas.

Se llevo a cabo el estudio funcional de las distintas variantes genéticas identificadas en nuestro estudio mediante la información proporcionada por las distintas base de datos: Ensembl [<http://www.ensembl.org/index.html>], HGMD (Human Gene Mutation Database (HGMD®), dSNPs [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>] e Interpro [<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>]. La información fue complementada por los algoritmos de predicción de eventos de splicing [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>, <http://regna2.mbc.nctu.edu.tw/>, <http://sfmap.technion.ac.il/index.html>], algoritmos de predicción de unión de microRNAs [<http://www.targetscan.org/>]. Para la visualización de proteínas se utilizó el programa pymol [<http://www.pymol.org/>]. Asimismo, la información fue complementada por los algoritmos SIFT, PolyPhen, PMut y el estudio de conservación evolutiva interespecifica.

El estudio “*in silico*” de la posible patogenicidad de las mutaciones no sinónimas “*missense*” p.R161W, p.H163Y, p.K238E, p.G262R , p.E274D, p.R321C y p.G405S del gen *SQSTM1* así como de la variante polimórfica RANK rs1805034 p.V192A

localizadas en regiones codificantes se evaluó mediante la utilización de diferentes software de predicción:

- PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, Prediction of Funtional Effect of Human nsSNPS) [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>]. Polyphen predice el grado de patogenicidad en base a tres tipos de aproximaciones: caracterización de la secuencia donde se produce la sustitución, grado de conservación de la sustitución proteica y posible alteración de la estructura 3D de la proteína. En base a estas predicciones Polyphen clasifica las variantes como “Benigna” o alta probabilidad que no tenga ningún efecto, “Posiblemente deletérea” y “Probablemente deletérea” con una alta probabilidad de patogenicidad por afectar a la estructura o función proteica. También la puede identificar como “incierta”, cuando no existen datos suficientes para que el programa realice la predicción.

- SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)[<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>]. Este algoritmo permite conocer los posibles efectos de una sustitución aminoacídica sobre la función proteica en base a la homología entre secuencias y las propiedades físicas de los aminoácidos. El software busca secuencias similares, las alinea y posteriormente calcula los scores en base a los diferentes aminoácidos que aparecen en cada posición de alineamiento proporcionando el resultado de si afecta o no a la función de la proteína.

Las puntuaciones de PolyPhen-2 y SIFT utilizan el mismo rango, de 0,0 a 1,0, pero con significados opuestos. Polypen-2 asigna una puntuación de 0 a 1 a la probabilidad de que la variante pueda ser perjudicial. Se predice que una variante con una puntuación PolyPhen-2 de 0.0 será benigna. En cambio, se predice que una variante con una puntuación SIFT de 1.0 será benigna.

- PMut [<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>]. La predicción del grado de patogenicidad en función de PMut se basa en la determinación del grado de conservación de la sustitución proteica y la posible alteración de la estructura 3D de la proteína. Este algoritmo genera un valor o score que es designado como patógeno para valores >0.5, y neutro para valores inferiores. Esta herramienta ha sido utilizada para la predicción de la patogenicidad de todas las variantes “*missense*” y “*nonsense*” localizadas en el estudio.

El análisis de la conservación inter-específica de las secuencias proteicas se realizó con el programa Clustal Omega [<https://www.uniprot.org/align>], introduciendo las secuencias a comparar en formato FASTA. El programa Clustal Omega permite el alineamiento de múltiples secuencias de proteínas, permitiendo ver las similitudes o diferencias entre las secuencias alineadas.

Control de calidad

Los datos genéticos fueron sometidos a un procedimiento de control de calidad estándar en los estudios de asociación, en función de la desviación del equilibrio Hardy Weinberg y la tasa de genotipado. El equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó en los pacientes y los controles comparando la distribución de SNP observada con la distribución esperada mediante la prueba de chi-cuadrado. Derivado de ecuaciones matemáticas para respaldar la teoría de la herencia mendeliana, la prueba de Hardy-Weinberg demuestra que en una gran población de individuos sujetos a apareamiento aleatorio, las proporciones de alelos y genotipos en un locus permanecen sin cambios a menos que se introduzcan influencias perturbadoras específicas, como la selección natural, fallos en la técnica de genotipado o que se produzca una mutación, este principio es básico y sobre él se basa el resto del estudio estadístico de asociación, por lo tanto, es considerado como un primer paso para el filtrado de aquellas variantes que no cumplen los requerimientos mínimos para el estudio de asociación genética.

En relación al control de calidad, todos los SNP fueron genotipado con éxito utilizando la tecnología MassARRAY*i*PLEX de alto rendimiento de Sequenom® (San Diego, CA, EE. UU.). Según el informe de Sequenom, la tasa media de datos de genotipo faltantes fue ~ 0.014% y la tasa de error de genotipado promedio se estimó a través de la duplicación ciega del 9% del total de muestras, mostrando un 100% de concordancia, siendo el porcentaje de éxito del genotipado $\geq 98.60\%$.

4.3. Aspectos éticos

Los pacientes fueron informados ampliamente sobre los objetivos y procedimientos del estudio y su posible participación de forma voluntaria, antes de firmar el consentimiento informado aprobado por el CEIC de del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar.

A cada uno de los pacientes a los que se les propuso participar en el estudio, se les entregó un documento escrito denominado Hoja de Información al paciente, que contenía la información relevante y necesaria para que el paciente pudiera decidir si deseaba participar en el estudio.

El paciente podía conocer sus resultados si así lo expresaba y retirarse voluntariamente del estudio. Se respetó en todo momento la confidencialidad de los datos personales y genéticos del paciente según los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas y el análisis de los datos se realizó de forma anonimizada.

El estudio fue aprobado por el comité ético (CEIC) del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, con el número de registro (2007/2885/I) siguiendo las directrices nacionales e internacionales (código deontológico, Declaración de Helsinki), así como las Guías Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica (International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies and International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects (Council for the International Organizations of Medical Sciences-CIOMS-Ginebra, 1991) y la normativa legal sobre la confidencialidad de los datos (Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales [LOPDGDD]).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Estudio clínico y epidemiológico de la enfermedad ósea de Paget.

5.1.1. Porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP durante el período de estudio, comprendido entre 1970 y 2009, en nuestra área de baja prevalencia. Influencia del género en dichos cambios seculares.

Durante el periodo de estudio comprendido entre enero de 1970 y diciembre de 2009 se diagnosticaron un total de 393 pacientes en la consulta monográfica de metabolismo óseo del Hospital del Mar-Parc de Salut Mar (Barcelona).

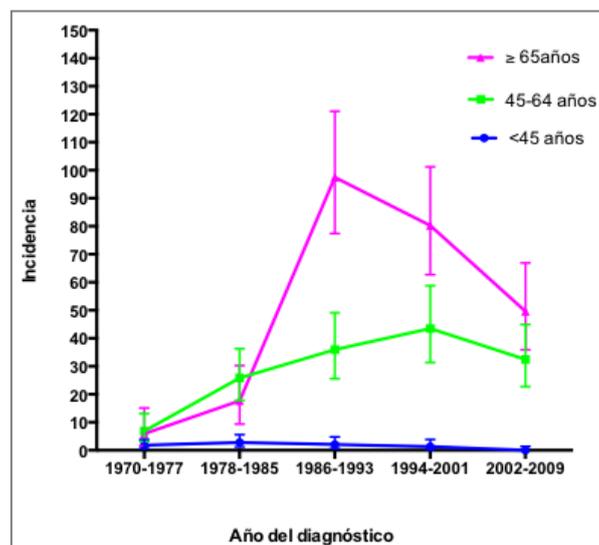
La evaluación de los cambios observados en el porcentaje de nuevos diagnósticos afectados de EOP en esta área de baja prevalencia, correlacionado con la población de riesgo de esa misma área, y estratificados según la edad en el momento del diagnóstico, durante el periodo de 1970 a 2009, se detallan en la tabla 10, 11 y gráfico 1. En términos generales, observamos un aumento progresivo de porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP durante los 3 primeros periodos del estudio, siendo máximo en el periodo (1986-1993) mostrando un descenso posterior del 40,41% en relación al último periodo de estudio, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.0001$). Si analizamos más detalladamente la evolución de la tasa de los nuevos diagnósticos de los pacientes afectados de EOP, en función de los tres grupos de edad en relación a la edad del diagnóstico, observamos que existe un incremento en los dos primeros periodos de estudio con una tendencia a la correlación inversa en los tres últimos periodos entre el porcentaje de nuevos diagnósticos y el periodo de estudio en el grupo de pacientes < 45 años ($p = 0.045$). No observándose ningún diagnóstico de EOP en el último período del estudio (2002-2009), en este grupo de edad. De la misma forma, en el grupo de pacientes del grupo de 45-64 años y ≥ 65 años, se observa una correlación positiva entre el porcentaje de nuevos diagnósticos afectados de EOP y el periodo de estudio, siendo máxima en el tercer período (1986-1993) para el grupo ≥ 65 años y en el cuarto período (1994-2001) para el grupo 45-64 años, con un descenso más marcado en el grupo de mayor edad, del 49,07% (grupo de ≥ 65 años), respecto al 25,4% (grupo 45-64 años) en relación al último período del estudio, siendo estadísticamente significativa estas diferencias en ambos grupos ($p < 0.0001$). Por lo que durante el periodo de seguimiento, existe un descenso de la incidencia de EOP en los dos últimos periodos de estudio, mostrando una tendencia secular a presentarse con mayor edad en el momento del diagnóstico.

Tabla 10. Número (%) de nuevos diagnósticos de EOP, estratificados según los grupos de edad y los periodos de estudio.

	1970-1977		1978-1985		1986-1993		1994-2001		2002-2009	
Edad	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<45 años	6	32	8	15	5	4	3	3	0	0
45-64 años	9	47	33	61	39	31	42	36	36	46
≥ 65 años	4	21	13	24	81	65	71	61	43	54
Total	19		54		125		116		79	

Tabla 11. La incidencia de nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo. Se expresa con la media (IC 95%) por 100.000 personas-año. Estratificados según los grupos de edad y los periodos de estudio.

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2002-2009
Edad					
<45 años	1,81 (0,70-3,90)	2,82 (1,20-5,60)	2,07 (0,70-4,80)	1,35 (0,30-3,90)	0,00 (0,00-1,40)
45-64 años	6,89 (3,10-13,10)	25,85 (17,80-36,30)	35,95 (25,60-49,10)	43,52 (31,40-58,80)	32,46 (22,70-44,90)
≥ 65 años	5,91 (1,60-15,10)	17,72 (9,40-30,30)	97,48 (77,40-121,10)	80,27 (62,70-101,20)	49,64 (35,90-66,90)
Total	3,59 (2,16-5,60)	11,14 (8,37-14,54)	28,84 (24,01-34,36)	28,46 (23,52-34,14)	16,96 (13,43-21,14)

**Gráfico 1.** Cambios seculares en la incidencia por 100.000 personas-año de los nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudio.

En relación a la influencia del género sobre esta tendencia observada en nuestra población de pacientes, se detalla en la tabla 12 y gráfico 2. Se observa que el ratio entre hombre y mujeres tiende a 1, en todos los periodos del estudio.

En cuanto, al porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP según el género y estratificados según la edad del diagnóstico en los diferentes periodos del estudio, se observa un comportamiento secular superponible al estudio de la población global, mostrando la misma tendencia entre el porcentaje de nuevos diagnósticos y el período de estudio en el grupo de pacientes <45 años, tanto en hombres como en mujeres ($p>0.001$). En cuanto a los otros grupos de edad, también se observa un aumento en la incidencia de los pacientes siendo máximo en el período (1986-1993) para la población ≥ 65 años y en el período (1994-2000) en el grupo de 45-64 años, con un descenso posterior más marcado en el grupo ≥ 65 años, siendo estadísticamente significativo en ambos sexos. En el grupo de ≥ 65 años el descenso es de 54.64% (mujeres) y del 43.1% (hombres), siendo estadísticamente significativo en ambos grupos (en hombres $p=0.0013$ y en mujeres $p=0.0011$). En el grupo de 45-65 años, el descenso es del 12,1% para mujeres y 36.4% para hombres, siendo estadísticamente significativo tanto en hombres ($p=0.0021$) como en mujeres ($p=0.0025$).

Tabla 12. La incidencia por 100.000 personas-año de nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo, según el género. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudio.

	1970-1977		1978-1985		1986-1993		1994-2001		2002-2009	
	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre
Edad										
<45 años	1,22 (0,10-4,40)	2,38 (0,60-6,10)	3,5 (1,20-8,30)	2,09 (0,40-6,10)	2,51 (0,50-7,30)	1,63 (0,20-5,90)	0,91 (0,00-5,10)	1,76 (0,20-6,40)	0 (0,00-2,90)	0 (0,00-2,60)
45-64 años	8,23 (3,0-17,90)	5,18 (1,10-15,20)	23,15 (13,20-37,60)	29,05 (16,90-46,50)	29,66 (17,30-47,50)	43,01 (27,0-65,10)	37,72 (22,70-58,90)	49,84 (31,60-74,80)	33,15 (20-51,80)	31,71 (18,50-50,80)
≥ 65 años	4,61 (0,60-17,10)	7,92 (1,0-28,6)	15,04 (6,0-31,0)	22,27 (8,20-48,7)	87,76 (64,30-117,0)	114,10 (79,5-158,6)	80,51 (58,5-108,10)	79,87 (52,60-116,20)	39,80 (24,60-60,8)	64,96 (40,7-98,3)
Total	3,59 (1,72-6,60)	3,58 (1,64-6,81)	10,96 (7,28-15,83)	11,34 (7,41-16,63)	28,79 (22,26-36,62)	28,89 (21,99-37,27)	29,89 (23,02-38,17)	26,88 (20,07-35,25)	16,83 (12,03-22,92)	17,09 (12,15-23,36)
Total	3,59 (2,16-5,60)		11,14 (8,37-14,54)		28,84 (24,01-34,36)		28,46 (23,52-34,14)		16,96 (13,43-21,14)	
Género Ratio	1		1,04		1		1,11		1	

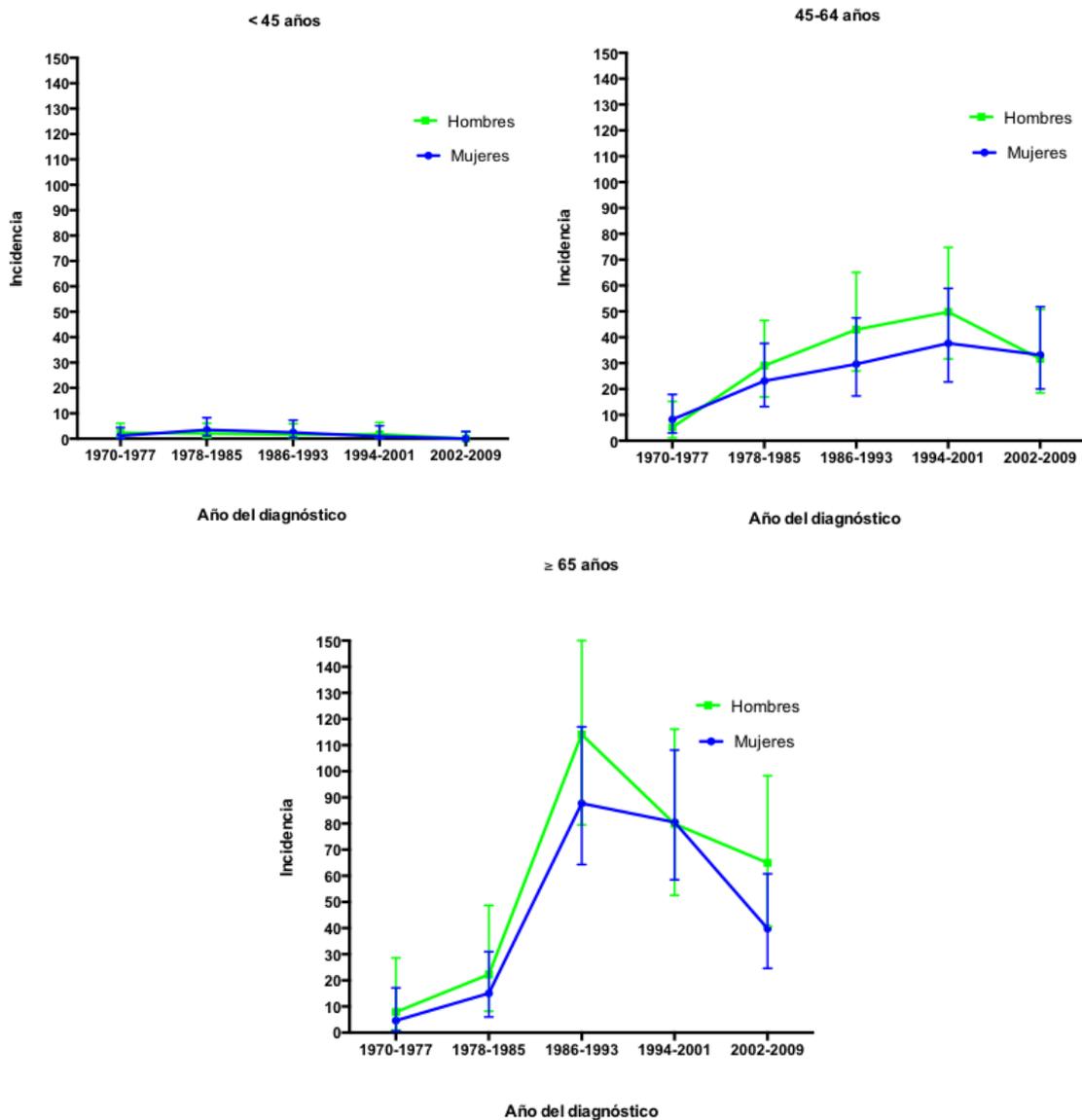


Gráfico 2. Cambio secular en la incidencia por 100.000 personas-año de los nuevos diagnósticos de EOP expresado en relación a la población de riesgo, según el género. Estratificados según los grupos de edad y periodos del estudios.

5.1.2. Características clínico-demográficas al diagnóstico de los pacientes afectos de EOP y complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad, así como diferencias en función del género, de la captación gammágrafica y de la presencia de una historia familiar positiva en la forma de presentación de la EOP

Las características clínico-demográficas de los pacientes en el momento del diagnóstico, las intervenciones farmacológicas realizadas y complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad, así como la influencia del género, se describen en la tabla 13.

De un total de 393 pacientes afectos de EOP, el 53% de la población eran mujeres, siendo la edad media en el momento del diagnóstico 65.26 ± 12.87 , no mostrando

diferencias significativas entre ambos sexos, aunque se observa una tendencia del sexo femenino en el grupo de mayor edad (≥ 75 años). El 6.39% de los pacientes de EOP presentaba una historia familiar asociada, sin diferencias entre ambos sexos ($p=0.586$). El 94,1% de los pacientes se encontraba asintomático, no presentaron síntomas atribuibles a la enfermedad en el momento del diagnóstico, sin diferencias respecto al género ($p=0.993$). En el momento del diagnóstico, tan solo 19 pacientes presentaban sintomatología, siendo el dolor óseo y/o articular, la limitación funcional de la movilidad articular y los síntomas craneales, las manifestaciones clínicas más frecuentes. En relación a la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, la media de huesos afectados evaluado por gammagrafía ósea era de 2.351 ± 1.75 , mostrando mas extensión de la enfermedad en el sexo masculino (2.629 ± 1.93) ($p=0.0036$) respecto al femenino. También se objetivo mayoría de casos polioestoticos en el hombre ($p=0.007$), sin presentar diferencia significativa en ambos sexos en relación al índice de Coutris ($p=0.2210$) o al índice anatómico de Renier ($p=0.1109$). En relación a la actividad de la enfermedad, evaluada por marcadores biológicos como los múltiplos del límite superior de la normalidad de la FA, fue de 3.184 ± 4.77 , sin observarse diferencias estadísticas respecto al género ($p=0.564$). Tampoco se objetivo diferencias en relación al índice de actividad de Renier ($p=0.128$), a pesar de evidenciarse una tendencia de mayor actividad en el varón, sin presentar significación estadística. En 370 pacientes se llegó al diagnóstico de forma casual; un 32.9% presentó un aumento de FA, el 40.87% por hallazgos radiológicos y el 19.02% por alteraciones gammagráficas sugestivas de enfermedad, sin mostrar diferencias respecto al género ($p=0.289$). Durante el curso de la enfermedad el 16.21% ha presentado dolor óseo, 25.2% artropatía degenerativa por vecindad, siendo las localizaciones más frecuentes la coxartrosis (21.1%) y la gonartrosis (5.09%), el 14.25% mostró síntomas craneales y el 17.04% deformidades óseas, con menor frecuencia de aparición, se presentaron las fracturas en hueso pagético (5.85%), y un 6.1% de los pacientes han mantenido intervenciones quirúrgicas como consecuencia de la EOP. Únicamente evidenciamos un caso de degeneración sarcomatosa, en una paciente afecta de Paget craneal.

En cuanto al tratamiento requerido durante el periodo de estudio, el 66,8% han mantenido tratamiento antirresortivo en alguna ocasión durante el seguimiento, sin diferencias estadísticamente significativas en relación al género ($p=0,117$).

En relación a diferencias en cuanto al género, las mujeres tienen una mayor tendencia a la afectación monostótica, con menor número de huesos afectados, con una mayor edad en el momento del diagnóstico, y una representación mayor en el grupo ≥ 75 años, respecto al hombre. En cuanto a las complicaciones acaecidas durante el transcurso

de la enfermedad, se ha observado mayor prevalencia de coxartrosis ($p=0,050$) secundarias a EOP y afectación craneal ($p=0,005$). En contraposición, los hombres tienen una mayor afectación poliostótica con mayor número de localizaciones afectas asociado a una mayor actividad de la enfermedad, sin llegar a la significación estadística.

Tabla 13. Características clínico-demográficas de los pacientes en el momento del diagnóstico, así como el tratamiento realizado y las complicaciones presentes durante el curso de la enfermedad y la influencia del género.

	Total	Mujer	Hombre	p-valor
Número de pacientes	393	208 (53%)	185 (47%)	
Edad (años), media (DS)	87.25±13.01	87.92±12.80	86.39±13.16	0.172
Edad al diagnóstico, media(DS)	65.26±12.87	65.85±13.13	64.51±12.55	0.2570
<45 años	22(5.5%)	11 (5.28%)	11 (5.95%)	
45-54 años	53 (13.5%)	26 (12.5%)	27 (14.59%)	
55-64 años	106 (27%)	51 (24.51%)	55 (30%)	
65-74 años	108 (27.5%)	57 (27.40%)	51 (27.56%)	
≥75 años	104 (26,5%)	63 (30.28%)	41 (22.16%)	
Año de diagnóstico, mediana (p25-p75)	1993 (1988-1999)	1994 (1988-1999)	1993 (1988-2000)	0.8771
Año de nacimiento, mediana (p25-p75)	1926 (1919-1935)	1924 (1918-1935)	1928 (1920-1936)	0.0726
Historia familiar de EOP (%)	25 (6.39%)	12 (5.85%)	13 (7.02%)	0.586
Número de huesos afectados, media (DS)	2.351 ±1.75	2.107±1.55	2.629±1.93	0.0036
Monostotico(%)	156 (39.7%)	95 (46%)	61(33%)	0.007
Poliostotico(%)	237 (60.3%)	113 (54.3%)	124(67%)	0.007
Índice anatómico Renier, mediana (p25 p75)	9.50 (4.50-21)	9.65 (4.50-22.82)	9.50 (4.50-18.32)	0.110
Índice de Coutris, mediana (p25 p75)	10(5-17)	10(5-17)	10 (5-20.9)	0.221
Síntomas				0.993
Asintomático (%)	370 (94.1%)	196 (94.2%)	174 (94.1%)	
Sintomático(%)	19 (4.9%)	10 (4.8%)	9 (4.9%)	
Pruebas diagnósticas al diagnóstico				0.289
Gammagrafía (%)	74 (19.02 %)	40(19.61%)	34 (18.48%)	

Resultados

Parámetros analíticos(%)	128 (32.9%)	63 (30.39%)	65 (35.87%)	
Radiografía (%)	159 (40.87%)	85 (41.18%)	74 (40.22%)	
Multiplos de FA, media (SD) (n=384)	3.184 ± 4.77	3.148±5.32	3.234 ±4.11	0.564
Rango Normal	78 (20.3%)	41 (20.2%)	37 (20.4%)	
< 3-veces sobre LSN	192 (50%)	106 (52.2%)	86 (47.5%)	
3 to 6 – veces sobre LSN	71 (18.5%)	34 (16.7%)	37 (20.4%)	
≥ 6- veces sobre LSN	43 (11.2%)	22 (10.83%)	21 (11.6%)	
Indice de actividad de Renier , mediana (p25- p75)	13.3 (5.5-25.5)	12.870 (6.147-24.497)	13.896 (4.593-27.126)	0.128
Tratamientos (terapias antirresortivas) (%)	245 (66.8%)	125 (63.8%)	120 (70.2%)	0.117
Complicaciones				
Dolor óseo (%)	59 (16.21%)	35 (18.72%)	24 (13.64%)	0.170
Coxartrosis debido a EOP (%)	83 (21.1%)	51 (24.5%)	32(17.3%)	0.050
Gonartrosis debido a EOP(%)	20 (5.09%)	8 (3.9%)	12 (6.5%)	0.264
Artropatía por EOP (%)	99 (25.2%)	58 (27.9%)	41(22.2%)	0.117
Pacientes con deformidad ósea(%)	67 (17.04%)	34 (16.34%)	33 (17.83%)	0.398
Fracturas en hueso pagético(%)	23(5.85%)	14 (6.8%)	9 (4.84%)	0.285
Cirugía secundaria a EOP(%)	24 (6.1%)	17 (8.7%)	7 (3.8%)	0.094
Paget craneal(%)	56 (14.25%)	39 (18.93%)	17 (9.14%)	0.005
Osteosarcoma secundario a EOP (%)	1 (0.25%)	1 (0.49%)	0	0.529

Respecto al patrón gammagráfico, se han objetivado diferencia en relación a las características clínico-demográficas de los pacientes en el momento del diagnóstico, el tratamiento requerido y las complicaciones presentes durante el curso de la enfermedad, en función de la distribución monostótica o poliostótica, se detallan en la tabla 14.

En relación a los casos con distribución gammagrafica monostótica, son pacientes más jóvenes con un diagnóstico más precoz y con una mayor predilección por el sexo femenino, siendo estadísticamente significativo respecto a los casos poliostóticos. A

diferencia, los pacientes poliostóticos se presentan con mayor frecuencia en el sexo masculino, con una media de 3.24 ± 1.77 huesos afectados, mostrando una correlación con el índice anatómico de Renier e índice de Coutris ($p=0.000$). Asimismo presentan mayores niveles séricos de FA al diagnóstico y un mayor índice de actividad de Renier, siendo el análisis de FA, el método diagnóstico más frecuentemente utilizado para su diagnóstico, mostrando significación estadística respecto a los casos monostóticos. En cuanto al tratamiento administrado durante el periodo de estudio, los paciente poliostóticos han requerido mayor número de terapias antiresortivas para el control de la enfermedad, mostrando diferencias estadísticamente significativas en relación a los pacientes con afectación monostótica ($p=0.000$). Respecto a las complicaciones los pacientes poliostóticos han mostrado mayor frecuencia de dolor óseo, artropatía y deformidad ósea secundarias a EOP, y afectación craneal siendo estadísticamente significativas, frente a los casos monostótico.

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes en el momento del diagnóstico, así como el tratamiento administrado y las complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad, en función de la captación gammagrafía (Monostótico/Poliostótico)

Distribución gammagrafía	Total	Monostótico	Poliostótico	P-valor
Número de pacientes	393	156 (39.69%)	237 (60.31%)	
Edad (años), media (Ds)	87.25±13.01	83.48±13.23	89.72±12.28	0.000
Mujer, n(%)	208 (53%)	95 (60.9%)	113 (47.7%)	0.013
Hombre, n(%)	185 (47%)	61 (39.1%)	124 (52.3%)	0.013
Edad al diagnóstico, media (Ds)	65.26±12.87	64.38±11.9	66.08±12.8	0.181
Año de diagnóstico mediana (p25-p75)	1993 (1988-1999)	1996 (1990-2002)	1992 (1986-1997)	0.00
Año de nacimiento mediana (p25-p75)	1926 (1919-1935)	1929 (1922-1941)	1923 (1916-1933)	0.00
Historia Familiar de EOP (%)	25 (6.39%)	7 (28%)	18 (72%)	0.432
Número de huesos afectados por gammagrafía ósea, media (Ds)	2.351 ±1.75	1	3.24±1.77	0.000
Índice anatómico de Renier, mediana (p25-p75)	9.50 (4.50-21)	4.5 (4-5-9)	14.8 (8.5-25.5)	0.000
Índice de Coutris, mediana (p25 p75)	10(5-17)	5 (5-5)	17 (10-24)	0.000
Síntomas al diagnóstico				
Asintomático, n (%)	370 (95.12)	145 (93%)	225(96%)	0.421
Sintomático, n (%)	19 (4.88%)	10 (6%)	9 (4%)	0.421
Pruebas diagnósticas al diagnóstico				0.029
Gammagrafía ósea, n(%)	74 (19.02 %)	39 (28%)	35 (16%)	
Análisis, n(%)	128 (32.9%)	39 (28%)	89(41%)	
Radiografía, n(%)	159 (40.87%)	62 (44%)	97 (43%)	
Múltiplos LSN FA, media (Sd) mediana (p25 p75)	3.184 ± 4.77 1.90 (1.10-3.38)	1.82±1.83 1.29 (0.83-2.16)	3.98±4.733 2.57 (1.43-4.52)	0.000
Índice de actividad de Renier mediana (p25 p75)	13.3 (5.5-25.5)	15.6 (6.6-29.5)	16.4 (4.9-21.4)	0.003
Tratamiento (terapia antiresortiva), n (%)	245 (66.9%)	71 (50.4%)	174 (77.3%)	0.000
Complicaciones				
Dolor óseo, n(%)	59 (16.21%)	18 (12%)	41 (17.3%)	0.040

Coxartrosis debido a EOP, n(%)	83 (21.12%)	27 (17.3%)	56 (23.6%)	0.084
Gonartrosis debido a EOP, n(%)	20 (5.09%)	5 (3.2%)	15 (6.3%)	0.217
Artropatia por EOP, n(%)	99 (25.2%)	31(19.9%)	68 (28.7%)	0.031
Deformidad ósea, n(%)	67 (17.04%)	20 (12.8%)	47 (19.8%)	0.046
Fracturas en hueso pagetico,n(%)	23(5.85%)	5 (3.2%)	18 (7.6%)	0.052
Cirugia secundaria a EOP,n(%)	24 (6.1%)	9 (5.8%)	15(6.3%)	0.586
Paget craneal,n (%)	56 (14.25%)	10 (6.4%)	46 (19.4%)	0.000
Osteosarcoma secundario a EOP, n(%)	1 (0.3%)	0	1 (0.4%)	0.603

El 6.42% de nuestra población presentan antecedentes familiares de EOP, mostrando diferencias significativas en relación a la presencia de clínica en el momento del diagnóstico y a los índices de severidad al diagnóstico, en relación al índice de Coutris ($p=0.043$), índice de actividad de Renier ($p=0.004$), múltiplos de FA ($p=0.045$), mayor número de localizaciones ($p=0.046$), y mayor número de casos polioestóticos ($p=0.023$), respecto a la población de EOP sin historia familiar. No mostraron diferencias significativas respecto a la población de EOP sin historia familiar positiva, en base a la presencia de la complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad y a la edad al diagnóstico ($p=0.160$).

5.1.3. Distribución anatómica de las lesiones óseas al diagnóstico en la población de EOP, la tendencia secular en función de año del diagnóstico, año de nacimiento y edad al diagnóstico, así como la influencia del patrón gammagráfico y del género en la topografía de las lesiones óseas.

En relación a la **distribución anatómica** de las lesiones óseas, el porcentaje de afectación de los diferentes huesos en la población de EOP y en función del género, se describen en la tabla 15 y gráfica 3. De las 20 localizaciones que se encuentran afectadas en nuestra población de pacientes, las más frecuentes con una frecuencia mayor del 10% son: Pelvis (60.3%), c.lumbar (27.3%), fémur (27.3%), cráneo (26.3%), sacro (20.6%), húmero (13.7%), c dorsal (13.9%), tibia (12.7%). Se han observado diferencias en cuanto al género. En las mujeres las localizaciones más frecuentes son, con una frecuencia mayor del 10%: Pelvis (59.6%)>cráneo (34.5)>fémur (24%)>c.lumbar (19.7%)>sacro (14.4%)>tibia (11.5%) y en el hombre: Pelvis (61.1%)>c.lumbar (35,7%)>fémur (30.8%)>sacro (27.6%)>c. dorsal (18.9%)> húmero (18.9%), cráneo (16.8%)>tibia (14.1%)>escápula (10,22%). Al comparar por género, se describen diferencias estadísticamente significativa entre ambos sexos, en relación a la afectación de la c.lumbar ($p=0.0004$), sacro ($p=0.0011$), húmero ($p=0.004$), c.dorsal ($p=0.002$), escápula ($p=0.008$) más frecuente en el hombre y la afectación craneal más frecuente en la mujer ($p=0.0001$).

Tabla 15. Porcentaje de distribución anatómica de las localizaciones afectas de EOP por gammagrafía ósea, en función del género.

Localización	Total	Mujer	Hombre	p-valor
Pelvis, n (%)	237(60.3%)	124(59,6%)	113(61,1%)	0.424
C. lumbar, n (%)	107(27.3%)	41(19,7%)	66(35,7%)	0.0004
Fémur, n (%)	107(27,3%)	50(24%)	57(30,8%)	0.144
Cráneo, n (%)	103 (26,3%)	72(34,6%)	31(16,8%)	0.0001
Sacro, n (%)	81(20,6%)	30(14,4%)	51(27,6%)	0.0011
Húmero, n (%)	54(13,7%)	19(9,1%)	35(18,9%)	0.004
C.dorsal, n (%)	53(13,9%)	18(8,7%)	35(18,9%)	0.002
Tibia, n (%)	50(12,7%)	24(11,5%)	26(14,1%)	0.275
Cara, n (%)	28(7,1%)	16(7,7)	12(6,5%)	0.396
Escápula, n (%)	25(6,4%)	7(3,4%)	18(10,2%)	0.008
Pie, n (%)	20(5,1%)	12(5,8%)	8(4,3%)	0.339
Clavícula, n (%)	18(4,6%)	10(4,8%)	8(4,3%)	0.507
Patela, n (%)	11(2,8%)	5(2,4%)	6(3,2%)	0.420
Estenón, n (%)	7(1,8%)	1(0,5%)	6(3,2%)	0.044
Cúbito, n (%)	5(1,3%)	2(1%)	3(1,6%)	0.445
Mano, n (%)	5(1,3%)	3(1,4%)	2(1,1%)	0.555
Costillas, n (%)	4(1%)	1(0,5%)	3(1,6%)	0.269
C.cervical, n (%)	3(0,8%)	2(1%)	1(0,5%)	0.544
Radio, n (%)	3(0,8%)	2(1%)	1(0,5%)	0.544
Peroné, n (%)	3(0,8%)	2(1%)	1(0,5%)	0.544

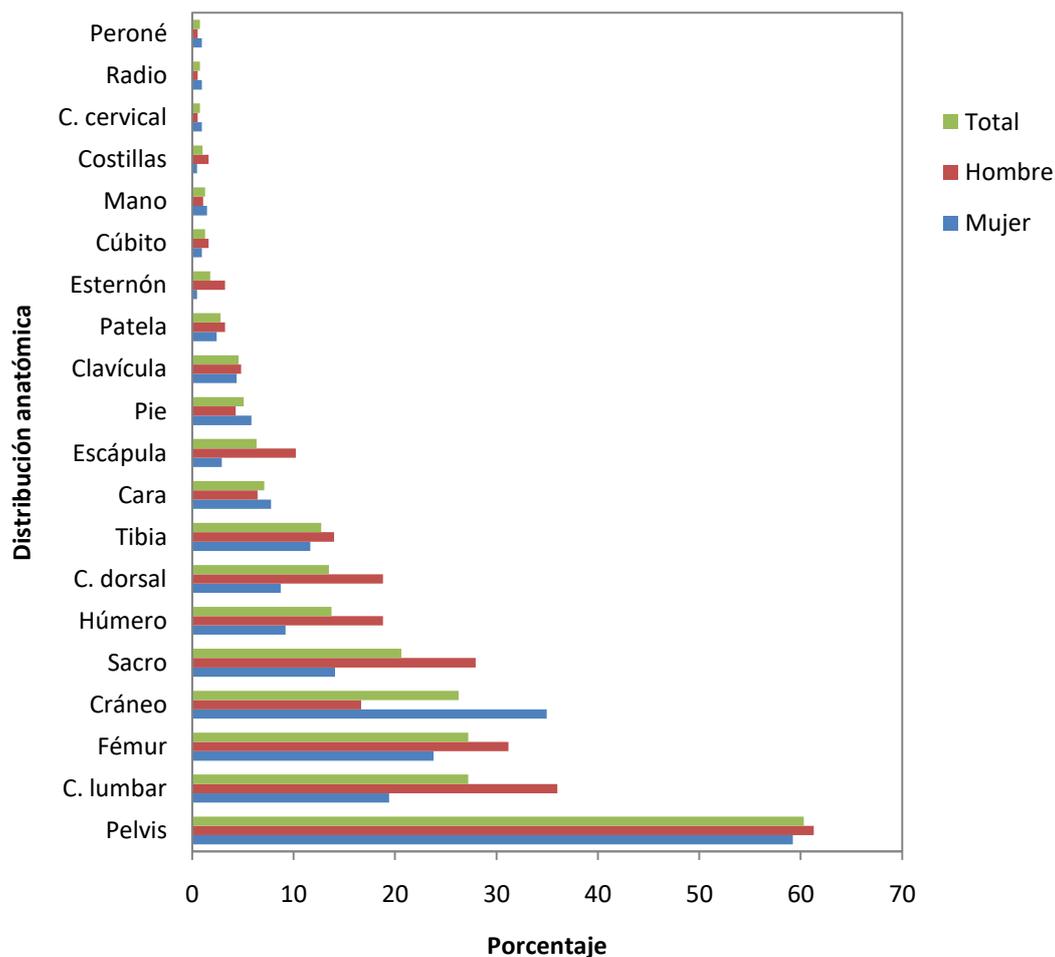


Gráfico 3. Porcentaje de la distribución anatómica de las lesiones óseas de la población afectada de EOP y la influencia del género.

En relación a la distribución anatómica de las lesiones óseas en función de la captación gammagráfica, detalladas en la tabla 16 y en la gráfico 4, se describen unas diferencias estadísticamente significativas en las diferentes localizaciones como son pelvis, c.lumbar, fémur, cráneo, sacro, húmero, c.dorsal, tibia, cara, escápula, pie, clavícula, patela y esternón con una frecuencia mayor en los casos polioestóticos respecto a los monostóticos. No observándose ninguna localización más prevalente en los casos monostóticos respecto a los polioestóticos. No se ha evidenciado afectación de las siguientes localizaciones como son patela, escápula, cúbito, peroné, radio, costillas, mano en nuestra población de casos monostóticos.

Tabla 16. Porcentaje de distribución anatómica de de las lesiones óseas afectas de EOP por gammagrafía ósea, en función del patrón gammagráfico (monostótico/poliostótico)

Localización	Total	Monostótico	Poliostótico	p-valor
Pelvis, n (%)	237(60,3%)	66(42,3%)	171(72,2%)	0.000
C. lumbar, n (%)	107(27,3%)	10(6,4%)	97(40,9%)	0.000
Fémur, n (%)	107(27,3%)	18(11,5%)	89(37,6%)	0.000
Cráneo, n (%)	103 (26,3%)	23(14,7%)	80(33,8%)	0.000
Sacro, n (%)	81(20,6%)	10(6,4%)	71(30%)	0.000
Húmero, n (%)	54(13,7%)	7(4,5%)	47(19,8%)	0.000
C.dorsal, n (%)	53(13,9%)	2(1,35)	51(21,5%)	0.000
Tibia, n (%)	50(12,7%)	10(6,4%)	40(16,9%)	0.001
Cara, n (%)	28(7,1%)	2(1,3%)	26(11%)	0.000
Escápula, n (%)	25(6,4%)	3(1,9%)	22(9,3%)	0.002
Pie, n (%)	20(5,1%)	3(1,9%)	17(7,2%)	0.015
Clavícula, n (%)	18(4,6%)	1(0,6%)	17(7,2%)	0.001
Patela, n (%)	11(2,8%)	0	11(4,6%)	0.003
Estenón, n (%)	7(1,8%)	0	7(3%)	0.028
Cúbito, n (%)	5(1,3%)	0	5(2,1%)	0.078
Mano, n (%)	5(1,3%)	0	5(2,1%)	0.078
Costillas, n (%)	4(1%)	0	4(1,7%)	0.131
C.cervical, n (%)	3(0,8%)	1(0,6%)	2(0,8%)	0.653
Radio, n (%)	3(0,8%)	0	3(1,3%)	0.218
Peroné, n (%)	3(0,8%)	0	3(1,3%)	0.218

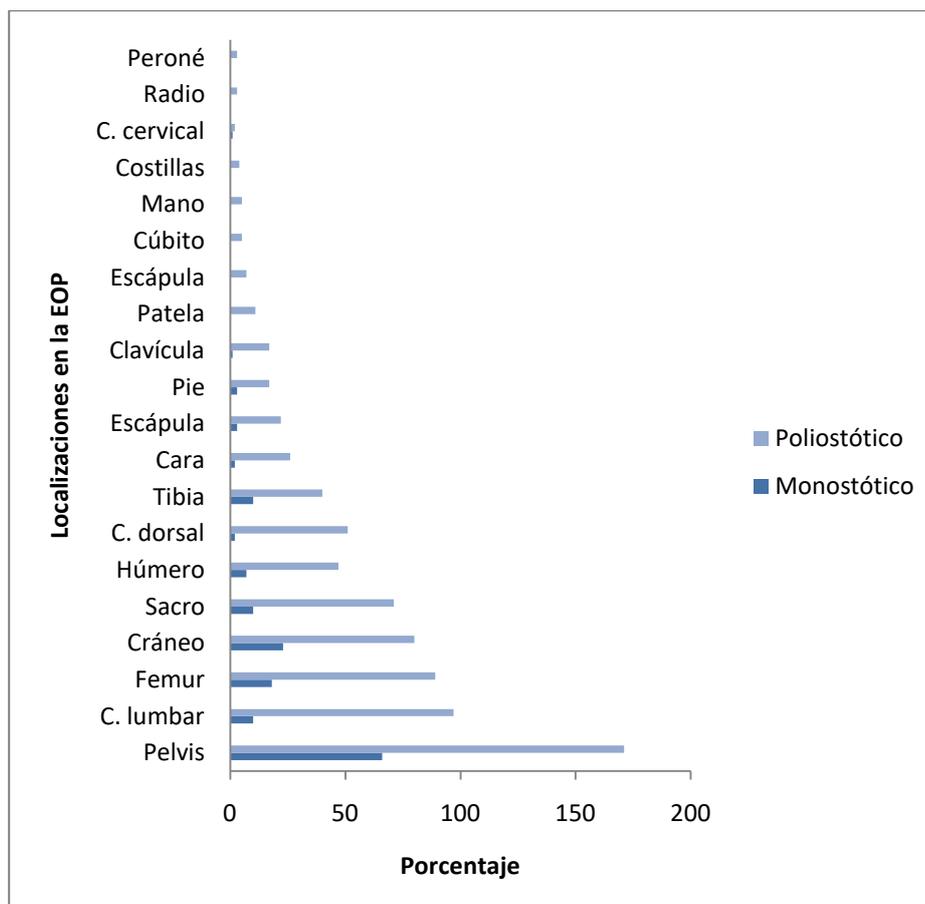


Gráfico 4. Porcentaje de la distribución anatómica de las lesiones óseas de la población afectada de EOP por gammagrafía, en función del patrón gammagráfico (Monostótico/Poliostótico).

En relación a la tendencia secular de la distribución anatómica observada durante los períodos de estudio establecidos en función del año de diagnóstico, año de nacimiento y edad en el momento del diagnóstico, se detalla en el gráfico 5. Se han incluido las 8 localizaciones que tienen una frecuencia superior al 10%.

En nuestra población, en relación al año del diagnóstico, se ha observado un descenso en todas las localizaciones, siendo más marcado y estadísticamente significativo en c. lumbar ($p < 0,0165$), dorsal ($p < 0,080$), húmero ($p < 0,0043$), fémur ($p < 0,0002$) y tibia ($p < 0,0025$). No evidenciándose modificaciones en la frecuencia de las localizaciones incluidas en la radiografía de abdomen ($p = 0,080$), herramienta diagnóstica en los estudios de prevalencia a nivel mundial.

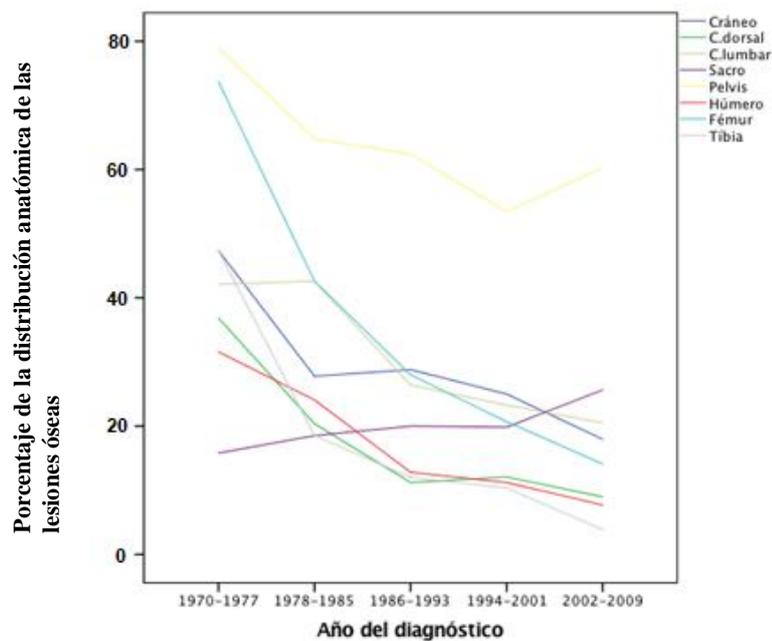
En relación al género, los hallazgos evidenciados son superponibles a los acontecidos cuando se analizan los datos globales, a diferencia de una disminución en la

afectación a nivel del esternón ($p=0.024$) y pelvis ($p=0.009$) en la mujer y en el hombre un descenso de la afectación en cráneo ($p=0,045$) y cara ($p=0.043$) (gráfico 6).

Respecto a la distribución gammagráfica (monostótico/polioistótico), se ha observado un descenso en todas las localizaciones, superponibles a la tendencia global, aunque en el último periodo de estudio se ha observado un aumento marcado a nivel del sacro ($p=0,020$) en los casos polioistóticos y la pelvis ($p=0.004$), en los pacientes con afectación monostótica (gráfico 6).

En cuanto al año de nacimiento, la distribución de las localizaciones esqueléticas, se observa una disminución en los últimos años respecto al primer periodo, en la localización de cráneo ($p=0.000$), c.dorsal ($p=0.896$), pelvis ($p=0.016$), fémur ($p=0.034$) y tibia ($p=0.039$), siendo estadísticamente significativo. Asimismo se observa en la localización de sacro ($p=0.714$) y c.lumbar ($p=0.302$) una tendencia lineal positiva en relación al año de nacimiento, sin presentar significación estadística.

En relación a la edad del diagnóstico, se observa un aumento en el diagnóstico de las localizaciones de sacro ($p=0.0012$), cráneo ($p=0.0019$) y pelvis ($p=0.037$) en las etapas más avanzadas (≥ 65) en comparación con menores de 55 años, siendo estadísticamente significativo. En el resto de localizaciones (c.dorsal, húmero, fémur, tibia y c.lumbar) existe una tendencia lineal negativa en relación a una mayor edad en el momento del diagnóstico, no mostrando significación estadística.



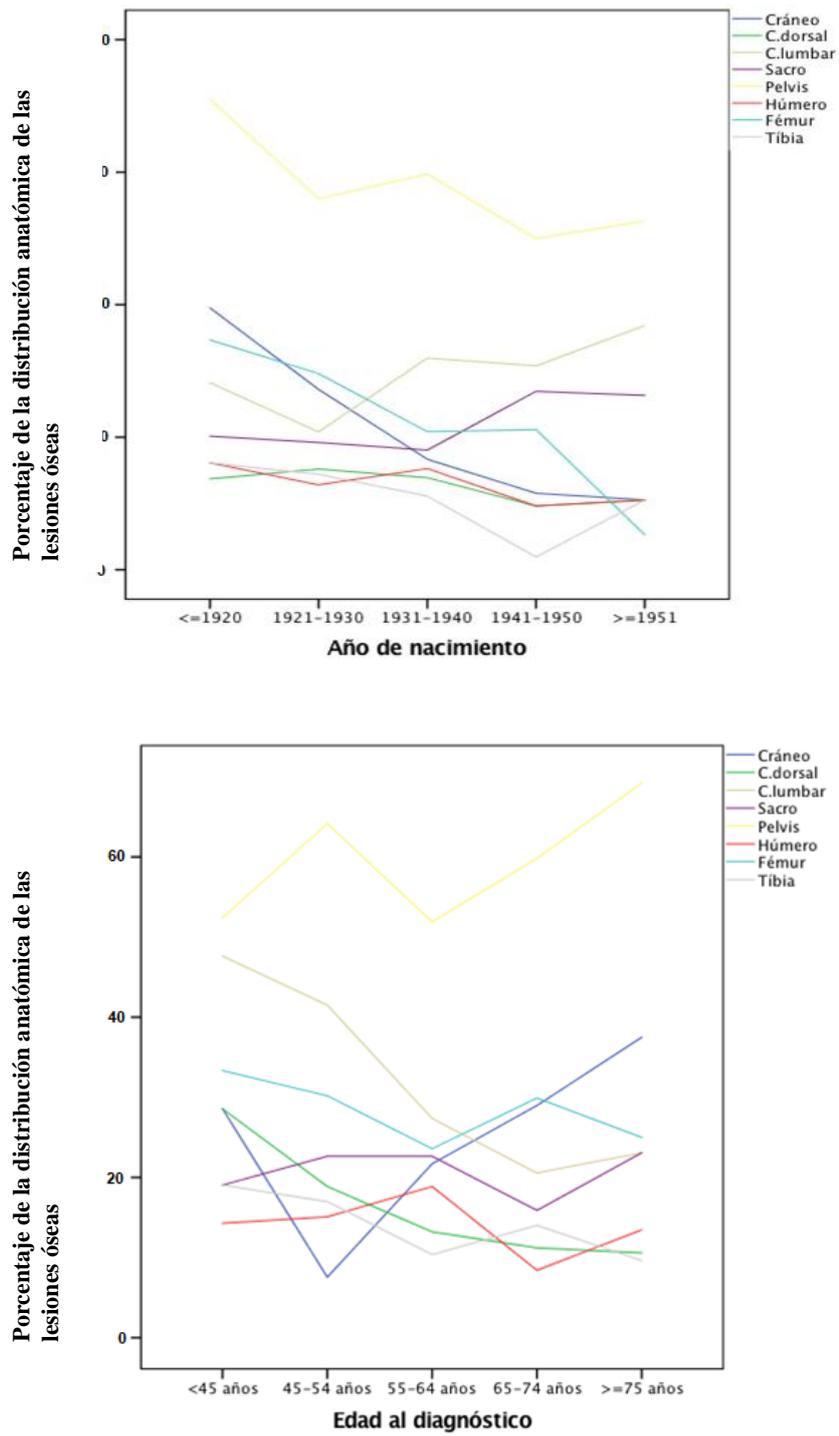


Gráfico 5. Cambios seculares de la distribución anatómica de las lesiones óseas, en porcentajes, respecto al año del diagnóstico, años de nacimiento y edad del diagnóstico.

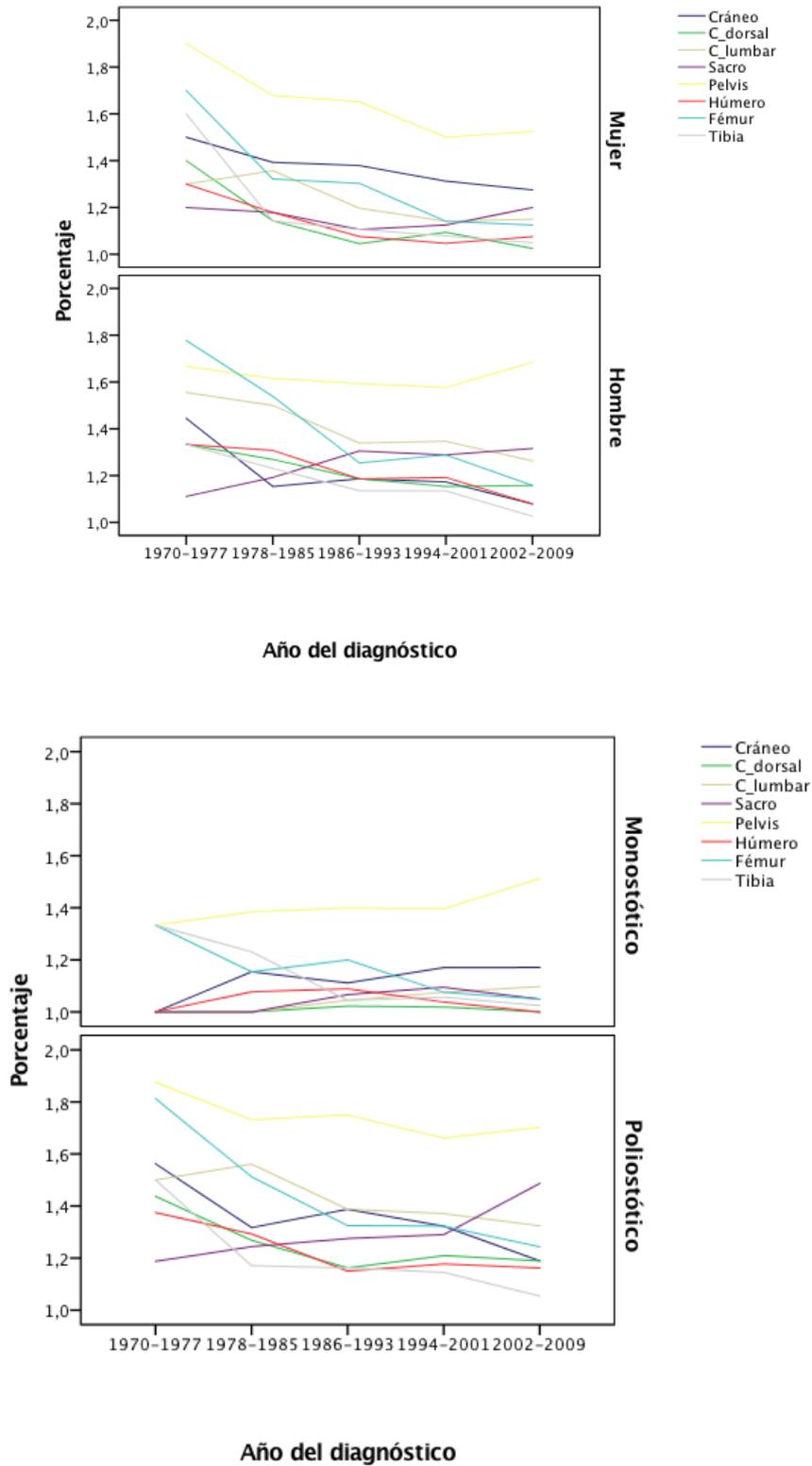


Gráfico 6. Cambios seculares de la distribución anatómica de las lesiones óseas, en porcentajes, respecto al año del diagnóstico, en función del género y de la captación gammagráfica.

5.1.4. Índices de severidad en el momento del diagnóstico, evaluada por la extensión y la actividad de la enfermedad en función del año del diagnóstico, año del nacimiento y edad al diagnóstico.

En cuanto a los índices de severidad, donde se incluyen los marcadores de actividad y de extensión durante el período de estudio en nuestra población, en función del año de diagnóstico y año de nacimiento, se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Cambios seculares de los índices de severidad (marcadores de actividad y extensión) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento.

	Año del nacimiento	Año del diagnóstico
Número de localizaciones	F: 3.924, p=0.004 r: -0.175, p=0.000	F: 5.46 p=0.0001 r: -0.297, p=0.000
Distribución gammagráfica (P/M)	X2: 22.390 p=0.000 r: -0.212 p=0.000	X2: 17.65 p=0.001 r: -0.210 p=0.000
Múltiplos de FA	T: -3.776 p=0.000 r: -0.207, p=0.000	T: -5.122 p=0.000 r: -0.294, p=0.000
Índice de Coutris	r: -0.217, p=0.000 F: 5,152, p=0.000	r: -0.298, p=0.000 F: 11.943 p=0.000
Índice anatómico de Renier	r: -0.284 p=0.000 F: 9.049, p=0.000	r: -0.307, p=0.000 F: 11.986, p=0.000
Índice de actividad de Renier	F: 1.064, p= 0.374 r: -0.056, p=0.274	F: 1.531, p=0.193 r: -0.063, p=0.218

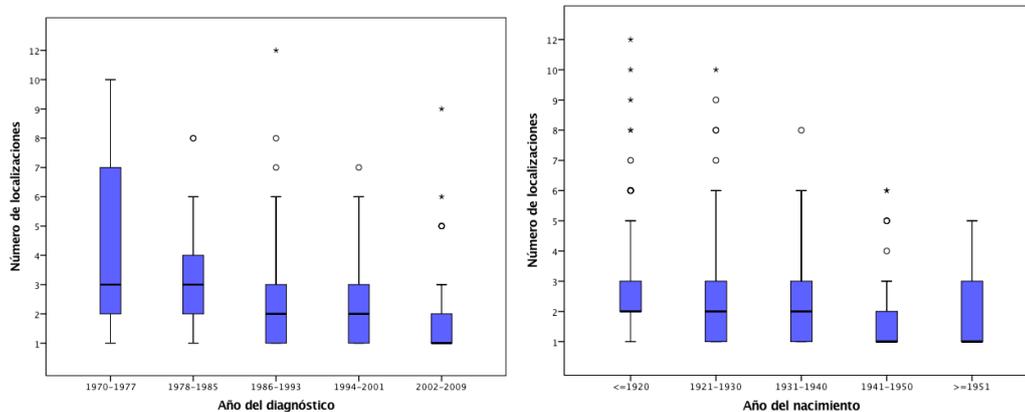
Estadístico utilizado: F (Test Anova), X2 (Chi-cuadrado), T (T-student), r (correlación de Pearson)

En nuestra población se ha observado una disminución de los índices de gravedad tanto de extensión como de actividad, evaluados mediante el número de localizaciones, distribución gammagráfica, índice de Coutris, índice anatómico de Renier y múltiplos de FA, descritos en el momento del diagnóstico en relación a los diferentes períodos de estudio tanto en función al año del diagnóstico como al año de nacimiento, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los periodos de estudio (gráfico 7 y 8). En el análisis de correlación entre los diferentes índices de actividad como son el número de localizaciones, distribución gammagráfica, múltiplos de FA, índice de Coutris e índice anatómico de Renier, se observó un correlación negativa, estadísticamente significativa en todos los casos. Se ha constatado en los índices de extensión, una buena correlación positiva entre el índice de Coutris e índice de Renier anatómico (r: 0.883, p=0.000) durante el periodo de estudio.

A pesar de observarse una disminución de la actividad durante los períodos del estudio, evaluada por los múltiplos de FA, no sé describe estos mismo hallazgos

cuando se evalúa mediante el índice de actividad de Renier, no mostrando diferencias significativas en los distintos períodos del estudio tanto en función del año del diagnóstico como con el año de nacimiento, así como una ausencia de correlación estadísticamente significativa.

En relación a la distribución gammagráfica, en función del año del diagnóstico, se observa una correlación positiva tanto en los casos monostóticos como en los poliostóticos, con una disminución más marcada en el último periodo de estudio ($p=0,001$). Durante el periodo de seguimiento, existe una mayor prevalencia de casos poliostóticos respecto a los monostóticos, excepto en el último periodo, donde se observa un mayor porcentaje de casos monostóticos ($p=0,003$). En cuanto al año del nacimiento, se ha observado una disminución de la frecuencia tanto de casos monostóticos como poliostóticos, con un porcentaje mayor de casos poliostóticos respecto a los monostóticos durante los 3 primeros periodos del estudio, mostrando en los dos últimos periodos del estudio, una mayor prevalencia de los casos monostóticos respecto a los poliostóticos. Mediante la realización de una regresión logística para el estudio de esta variable dicotómica en función del año del diagnóstico y el año del nacimiento, se observa una menor probabilidad de casos poliostóticos cuanto más elevado sea el valor de ambos años ($p=0.002$, $p=0.004$, respectivamente).



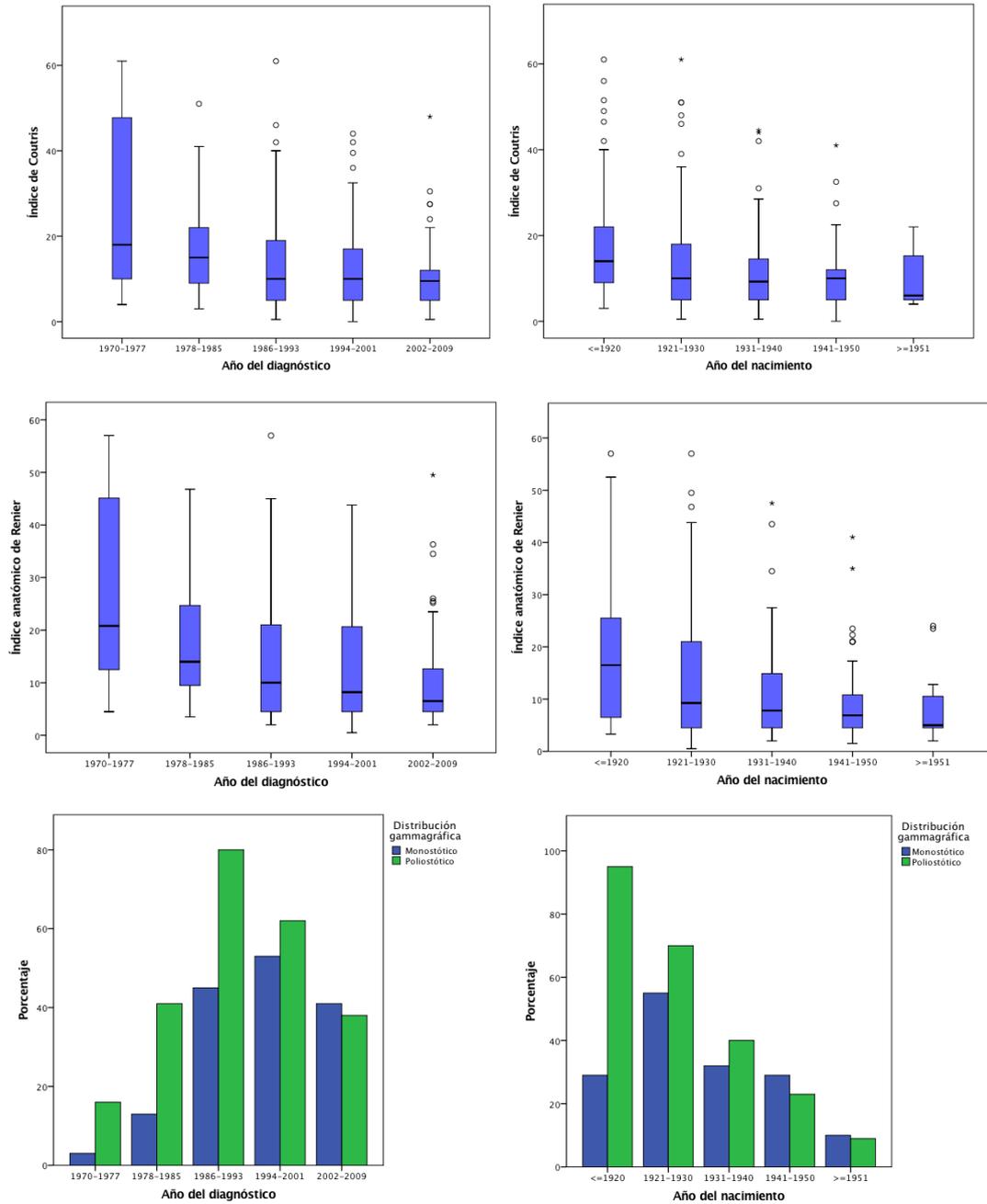


Gráfico 7. Cambios seculares de los índices de extensión (número de localizaciones, distribución gammagráfica, índice de Courtris, índice anatómico de Renier) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento.

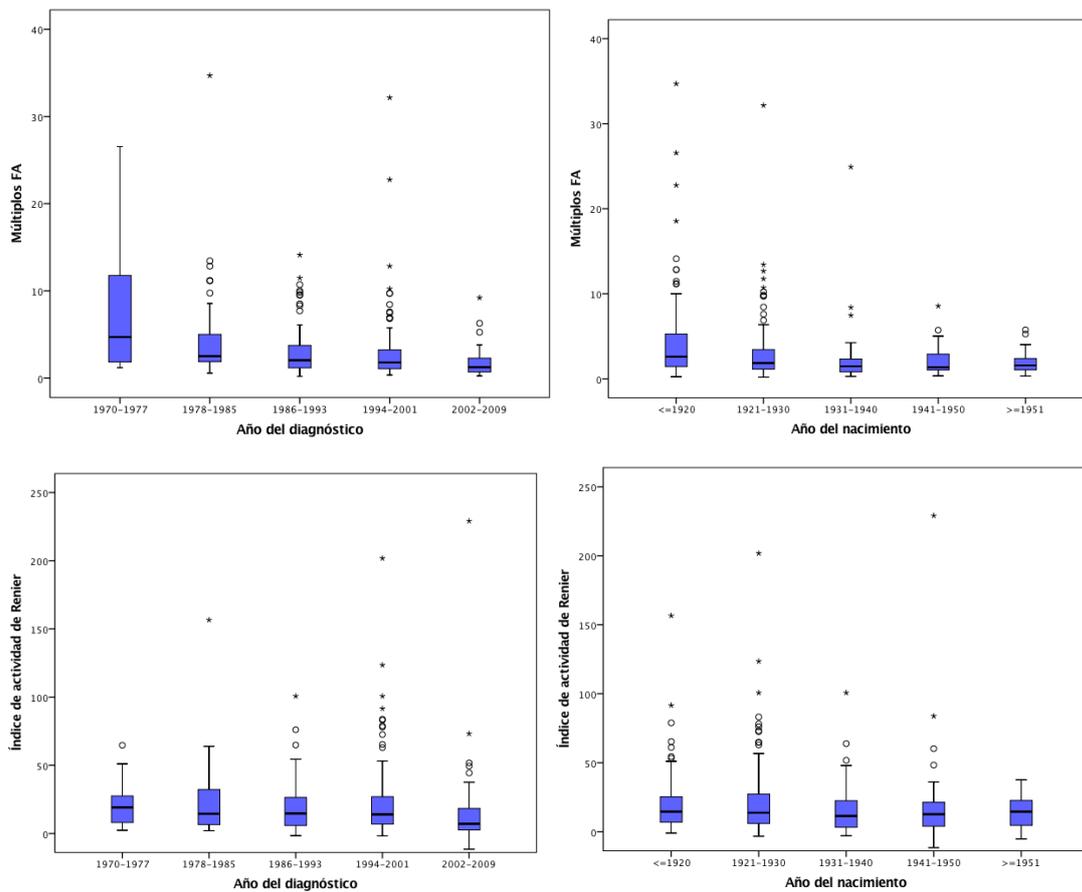


Gráfico 8. Cambios seculares de los índices de actividad (índice anatómico de Renier y múltiplos de FA) durante el período de estudio en nuestra población en función del año de diagnóstico y año de nacimiento

Al comparar la existencia o no de diferencias significativas entre la edad al diagnóstico y los índices de severidad tanto de extensión como de actividad (tabla 18, gráfico 9 y 10), observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en las edades extremas, es decir en el grupo <45 años y ≥ 75 años, mostrando más severidad en el momento del diagnóstico, en relación a los múltiplos de FA ($p= 0.015$), índice de Coutris ($p= 0.029$), índice anatómico de Renier ($p: 0.019$), número de localizaciones ($p=0.0269$) y distribución gammagráfica ($p=0.021$), con predominio de casos poliostóticos. Esta tendencia no se observa en relación al índice de actividad de Renier, como ocurre en los análisis previos con esta variable.

Tabla 18. Cambios seculares de los índices de severidad (marcadores de actividad y extensión) durante el periodo de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

	Edad al diagnóstico
Número de localizaciones	F:1.3139, p=0.0269 r:0.019, p=0.711
Distribución gammagráfica (P/M)	F:5.205, p=0.021 r: 0.090, p=0.075
Múltiplos FA	F: 3.2286,p= 0.015 r:0.019, p=0.705
Índice de Coutris	F 1.2441, p= 0.029 r:0.013, p=0.793
Índice anatómico de Renier	F: 4.028, p=0.019 r: 0.095, p=0.062
Índice de actividad de Renier	F: 0.293, p=0.746 r:0.007, p=0.887

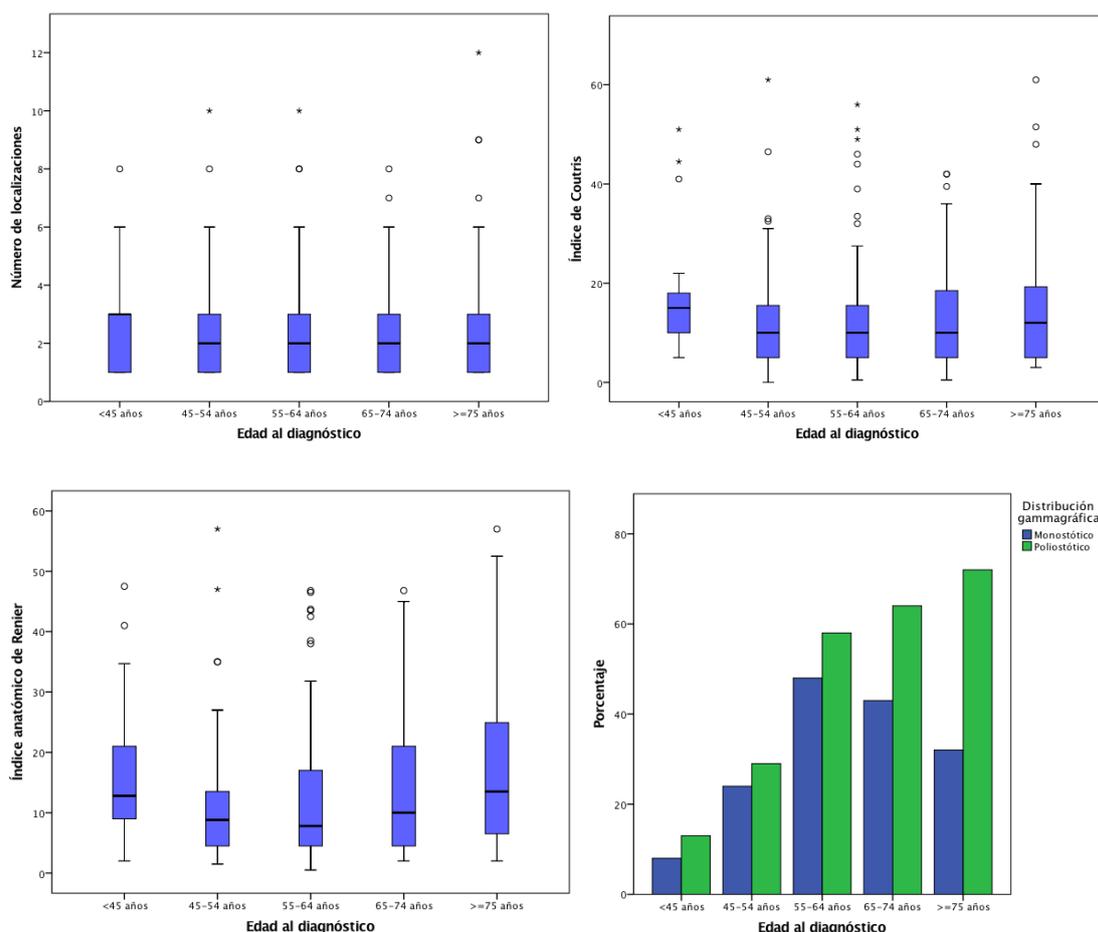


Gráfico 9. Cambios seculares de los índices de extensión (número de localizaciones, distribución gammagráfica, índice de Coutris, índice anatómico de Renier) durante el período de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

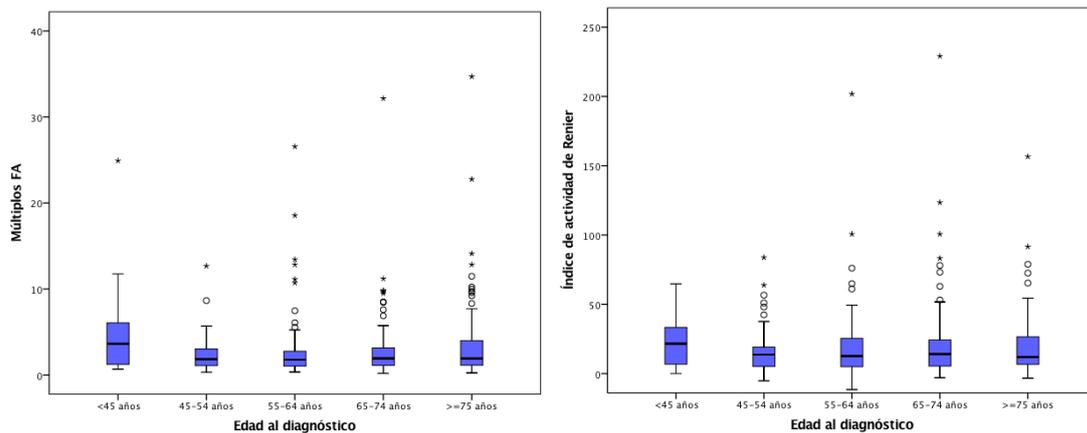


Gráfico 10. Cambios seculares de los índices de actividad (índice anatómico de Renier y múltiplos de FA) durante el período de estudio en nuestra población, en función de la edad al diagnóstico.

Respecto al género, se observa un comportamiento superponible a las tendencias evidenciadas en la población global, en relación a los índices de extensión y actividad, mostrando significación estadística en ambos grupos.

5.1.5. Variaciones en la edad al diagnóstico de los pacientes afectados de EOP en función del año del diagnóstico y del año del nacimiento

En relación al análisis de la edad en el momento del diagnóstico (gráfico 11), en función del año del diagnóstico, se describe diferencia significativas entre los diferentes períodos de seguimiento ($p=0.000$), mostrando una correlación positiva estadísticamente significativa ($r: 0.290, p= 0.000$), con una tendencia inicialmente ascendente en el periodo comprendido entre 1970 y 2001 con una estabilización en el último periodo de seguimiento. Sin embargo, al analizar la evolución de la edad al diagnóstico en función del año del nacimiento, encontramos una correlación negativa significativa ($r=0.702, p= 0.000$) observando diferencias estadísticamente significativas entre los intervalos establecidos.

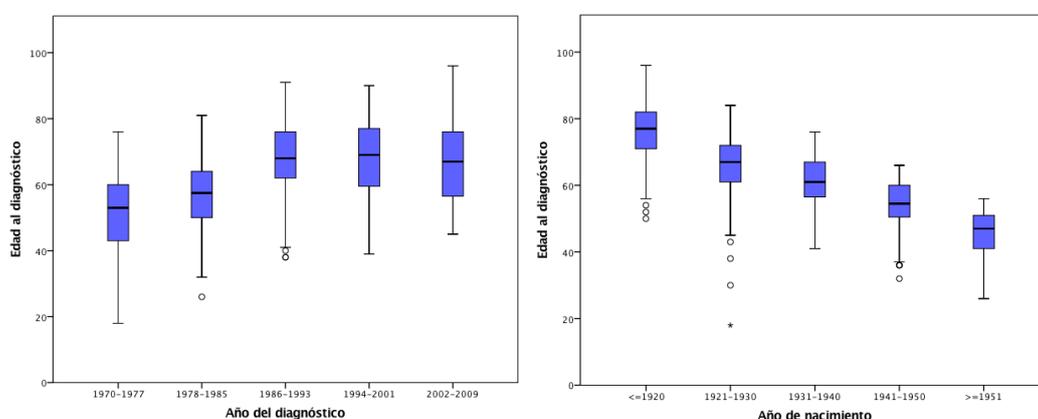


Gráfico 11. Cambios seculares de la edad en el momento del diagnóstico en función del año del diagnóstico y año del nacimiento.

5.1.6. Tendencia secular en el método diagnóstico utilizado en nuestra población de EOP en función del año del diagnóstico.

El diagnóstico de EOP en nuestra población asintomática se realizó en la mayor parte de los casos, por hallazgos típicos radiológicos (40.87%), un aumento de FA (32.9%) y el estudio gammagráfico (19.02%) sugestivo de esta enfermedad metabólica ósea. Durante el periodo de estudio se ha observado un cambio en el método diagnóstico, en relación con el año del diagnóstico (tabla 19).

Tabla 19. Tendencia secular en el método diagnóstico utilizado en nuestra población de EOP en función del año del diagnóstico.

	1970-1977	1978-1985	1986-1993	1994-2001	2001-2009
Gammagrafía (%)	2 (12.5%)	1 (2.1%)	10 (8.5%)	28 (26.4%)	33 (45.8%)
Análisis (%)	3 (18.7%)	20 (40.8%)	47(39.8%)	32(30.2%)	26 (36.1%)
Radiografía (%)	11 (68.7%)	28 (57.2%)	61(51.7%)	46(43.4%)	13 (18.1%)

Durante el periodo de estudio, se ha observado una correlación positiva entre la gammagrafía como método diagnóstico, en relación con los diferentes periodos de estudio, presentando significación estadística. Por el contrario, la radiografía ha disminuido su utilización como herramienta diagnóstica, mostrando una correlación negativa estadísticamente significativa con el año del diagnóstico. No obstante, la determinación de las FA, como método diagnóstico, se ha mantenido constante durante el periodo de estudio (gráfico 12).

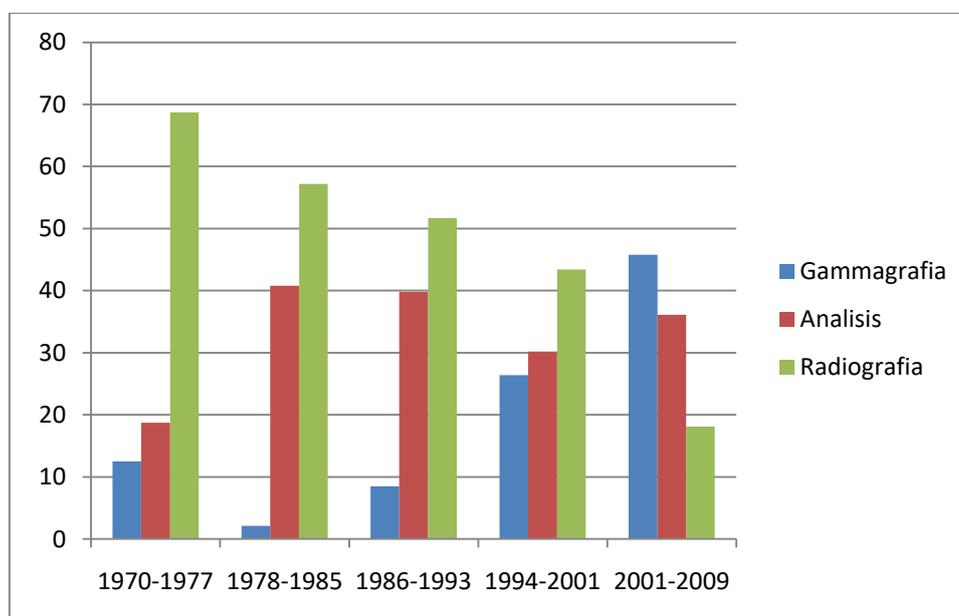


Gráfico 12. Caracterización de la tendencia secular en función del método diagnóstico utilizado en nuestra población de EOP en función del año del diagnóstico.

5.1.7. Complicaciones clínicas acaecidas durante el período de estudio en función de los índices de severidad

En relación a las complicaciones acaecidas durante el periodo de seguimiento, agrupado en deformidad secundaria (67 pacientes (17.04%)), artropatía por vecindad (99 pacientes (25.19%)), síntomas craneales (56 pacientes (14.25%)), fractura/cirugía (46 pacientes (11.70%)), dolor óseo (59 pacientes (16.21%)), analizamos su comportamiento con los índices de severidad en el momento del diagnóstico (tabla 20). En la tabla podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre el número de complicaciones y los índices de severidad estudiados, mostrando una correlación positiva estadísticamente significativa, excepto con el índice de actividad de Renier. Por tanto, los pacientes que han presentado más complicaciones durante el periodo de seguimiento, se asocian con una enfermedad más extensa (mayor índice de Coutris, mayor índice anatómico de Renier, más frecuencia de casos polioestóticos y mayor número de localizaciones) y más activa, con valores de múltiplos de FA más elevados en el momento del diagnóstico. Es decir, existe una correlación entre la existencia de un número mayor de complicaciones y mayores índices de actividad y extensión en el momento del diagnóstico.

Tabla 20. Asociación entre las complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad y los índices de severidad.

	Complicaciones
Número de localizaciones	T: 4.476, p= 0.000 r:0.019, p= 0.711
Distribución gammagráfica (P/M)	T: 2.320, p=0.021 r:0.134, p=0.011
Múltiplos FA	T: 5.155, p=0.000 r:0.282, p=0.000
Índice de Coutris	T: 3.806, p=0.000 r: 0.220, p= 0.000
Índice anatómico de Renier	T: 4.287, p= 0.000 r:0.268, p=0.000
Índice de actividad de Renier	T: 1.676, p=0.103 r:0.060, p=0.264

En el análisis de regresión logística para evaluar si las variables de severidad tanto de actividad como de extensión aportan información sobre la presencia de las diferentes complicaciones acontecidas. Hemos observado la existencia de relación entre la variable artropatía, con la presencia de múltiplos de FA ($p=0.0474$) y número de localizaciones ($p=0.0038$) en el momento del diagnóstico. Dado que ambas covariables muestran coeficientes positivos, el incremento de cualquiera estas covariables (múltiplos de FA y número de localizaciones), aumentará la probabilidad de presencia de artropatía. De la misma forma, ocurre con la variable fractura, dado que se ha observado un incremento de su presencia, en relación a los múltiplos de FA

($p=0.0038$) y número de localizaciones ($p=0.0026$) en el momento del diagnóstico. En relación a la variable deformidad, tanto la edad del diagnóstico ($p=0.0187$) con un coeficiente negativo y el número de localizaciones ($p=0.0001$) con un coeficiente positivo, aportan información a la presencia de deformidad. Por esta razón, cuando más temprana sea la edad en el momento del diagnóstico o mayor número de localizaciones, mayor será la probabilidad de presentar deformidades. En cuanto a los síntomas craneales, mediante el análisis de regresión logística, podemos observar que tanto la edad del diagnóstico ($p=0.045$), los múltiplos de FA ($p=0.000$) y el número de localizaciones ($p=0.0314$), van a aportar información sobre la presencia de esta complicación. Todas ellas con coeficientes positivos, por consiguiente el incremento en la edad al diagnóstico, en los múltiplos de FA o en el número de localizaciones se relaciona con una mayor probabilidad de presencia de síntomas craneales.

5.1.8. Identificación de factores predictores independientes de mal pronóstico al diagnóstico.

Mediante el análisis de regresión logística múltiple (modelo lineal generalizado. Regresión de Poisson) se han analizado las siguientes variables de severidad: múltiplos de FA, número de localizaciones, edad en el momento del diagnóstico, índice anatómico de Renier, índice de Coutris, índice de actividad de Renier, sexo y patrón gammagráfico, en el momento del diagnóstico y ajustando el análisis por la variable tratamiento (tabla 21), con el fin de explorar la existencia de factores predictores de mal pronóstico en el momento del diagnóstico, es decir, aquellos que van a favorecer peores desenlaces como la presencia de más complicaciones durante el curso de la enfermedad.

Tabla 21. Predictores independientes basales de la presencia de complicaciones durante el curso de la enfermedad.

Predictor	Coef B	Error estándar	T	p- valor
(Constante)	2.939	0.307	3.076	0.002
Edad al diagnóstico	-0.012	0.004	-5.803	0.016
Múltiplos FA	0.350	0.016	4.574	0.032
Índice anatómico de Renier	0.041	0.012	10.336	0.001
Núm de localizaciones	0.292	0.737	15.663	0.000
Género (F)	0.279	0.140	3.936	0.047

Ecuación de regresión de complicaciones= 2.939 - 0.012 edad diagnóstico+0.350 Múltiplos FA+ 0.041 Índice anatómico de Renier +0.292 Número localizaciones +0.279 Género (F)

S: 2.045 R cuadrado: 20.6%, R cuadrado (ajustado): 19%

Por consiguiente la presencia de mayor extensión evaluada por el índice anatómico de Renier y número de localizaciones, así como mayor actividad en el diagnóstico expresado por múltiplos de FA, edad más joven en el momento del diagnóstico y el género femenino, predicen mayores complicaciones durante el curso de la enfermedad. Estos cinco factores independientes de severidad en el momento del diagnóstico, en conjunto representan el 19% de la varianza de presentar complicaciones durante el curso de la enfermedad.

5.2. Estudio de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (*p62*) e identificación de variantes polimórficas en los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget.

Para llevar a cabo el estudio de asociación genética caso-control así como el estudio molecular, donde se pretende definir el papel de los polimorfismos *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*) así como identificar alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (*p62*), en la susceptibilidad para el desarrollo de la EOP en nuestra cohorte de pacientes, se analizaron un total de 200 pacientes con diagnóstico probado de EOP y a 200 controles hipernormales sin antecedentes de enfermedades metabólicas óseas y pareados en edad, sexo, etnia, región geográfica con el grupo de pacientes. Las características clínico-demográficas de nuestra cohorte de pacientes están recogidas en la tabla 22.

Tabla 22. Características clínico-demográficas de la población de estudio afecta de EOP.

	Pacientes EOP (n=200)
Género (M/H)	91 (45.3%)/109 (54,2%)
Año de nacimiento	
Media (Ds)	1935.64±10.444
Mediana(P25-P75)	1934 (1927-1945)
Edad del diagnóstico (años)	
Media (Ds)	61.96 ± 10.354
Mediana(P25-P75)	63 (55-69)
Año del diagnóstico	
Media (Ds)	1998 ± 8,286
Mediana(P25-P75)	1999 (1993-2004)
Historia familiar positiva de EOP	19 (9.5%)
Número de pacientes con Mutaciones <i>SQSTM1</i> (Pro392Leu)	40(20%)
Número de pacientes con Mutaciones <i>SQSTM1</i> +	54(27%)
Múltiplos de FA al diagnóstico	
Media (Ds)	3.75±3.44
Mediana(P25-P75)	2.77 (1.55-4.65)
Clínica: sintomáticos al diagnóstico	55 (27.5%)
Distribución gammagráfica (M/P)	92(46%)/108 (54%)
Numero de localizaciones	

Media (Ds)	2.45 ± 2.12
Mediana(P25-P75)	2 (1-3)
Tratamiento con BF, n(%)	92 (46%)
Número de tratamientos	
Media (Ds)	1.37 (1.28)
Mediana(P25-P75)	1 (0-2)
Número de complicaciones	
Media (Ds)	1.32±1.17
Mediana(P25-P75)	1.50(0-2)
Complicaciones asociadas a la evolución de la enfermedad:	
-Artropatía por vecindad, n (%)	112(56%)
-Sordera/ Paget craneal, n (%)	26 (13%)
-Deformidad, n (%)	102 (51%)
-Fractura y prótesis, n (%)	24 (12%)

En relación a la población incluida en el estudio genético de los diferentes genes seleccionados con una probable implicación en la fisiopatología de la EOP, y en función de la evaluación de las características clínico-demográficas de nuestra cohorte de pacientes en función del género (tabla 23), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los datos reportados siendo superponibles a los evidenciados en la población de EOP. Sin embargo, cabe descartar en el grupo de pacientes mujeres, una mayor tendencia a la afectación monostótica, con menor número de huesos afectados, con un mayor porcentaje de casos asintomáticos al diagnóstico y una mayor edad en el momento del diagnóstico sin llegar a la significación estadística, respecto a los varones.

Tabla 23. Características clínico-demográficas de la población afecta EOP, en función del género

	Mujer (n=91)	Hombre (n=109)	p- valor
Año de nacimiento. media (Ds)	1934±11.055	1937 ±9,777	0.061
Edad del diagnóstico (años), media (Ds)	63.18±10.870	60.94±9.838	0.068
Año del diagnóstico, media (Ds)	1997 ±8.302	1998±8,30	0.621
Historia familiar de EOP	8 (8.8%)	11 (10.1%)	0.475
Número de pacientes con Mutaciones SQSTM1 total	21 (23.1%)	33 (30.3%)	0.163
Número de pacientes con Mutaciones SQSTM1 (Pro392Leu)	16 (17.6%)	24 (22%)	0.274
Múltiplos de FAT al diagnóstico, media (Ds)	3.77±3.95	3.73±2.98	0.943
Clínica al diagnóstico (n=149)			
Sintomático	19 (20.9%)	36 (33%)	0.079
Asintomático	50 (54.9%)	44 (40.4%)	
Distribución gammagráfica:			
Monostótico	47 (51.6%)	45 (41.3%)	0.093
Poliostótico	44 (48.4%)	64 (58.7%)	
Número de localizaciones, media (Ds)	2,20±2,104	2,65±2,127	0.083
Tratamiento con BF (n=92)	42 (46.2%)	50 (45.9%)	0.105
Numero de tratamientos, media (Ds)	1,37 ±1,420	1,37 ±1,140	0.522
Número de complicaciones, media (Ds)	1.44±1.213	1.22 ±1.125	0.187

Complicaciones asociadas a la evolución de la enfermedad:			
-Artropatía por vecindad, n (%)	53 (58.2%)	59 (54.1%)	0.330
-Sordera/Paget craneal, n (%)	15 (16.5%)	11 (10.1%)	0.130
-Deformidad, n (%)	49 (53.8%)	53 (48.6%)	0.276
-Fractura, n (%)	14 (15.4%)	10 (9.2%)	0.130

El 9,5% de nuestra población incluida en el estudio genético presenta una historia familiar positiva de EOP (tabla 24), mostrando diferencias estadísticamente significativas en relación a los índices de severidad al diagnóstico en función de los niveles más elevados de múltiplos de FA ($p=0,049$) y una mayor extensión de la enfermedad en relación al número de localizaciones afectadas al diagnóstico ($p=0,035$), así como un mayor número de tratamientos realizados por paciente ($p=0,028$) y un número mayor de complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad ($p=0,040$), siendo la artropatía por vecindad ($p=0,028$) y las deformidades óseas ($p=0,032$) las más frecuentes en este grupo de pacientes, respecto a la población de EOP sin presencia de una historia familiar positiva. Asimismo el grupo de pacientes con antecedentes familiares de EOP mostraron una tendencia sin significación estadística en relación a un mayor porcentaje de casos poliostóticos y con presencia de síntomas al diagnóstico respecto a la población con historia familiar negativa. No mostraron diferencias significativas respecto a la población de EOP con historia familiar negativa, en función del género y de la edad al diagnóstico.

Tabla 24. Características clínico-demográficas de la población afecta de EOP en función de la presencia de una historia familiar positiva.

	Hª familiar positiva (n=19)	Hª familiar negativa (n=181)	p-valor
Género			
Mujer	8 (42,1%)	83 (45,9%)	
Hombre	11 (57,9%)	98 (54,1%)	0,475
Año de nacimiento, media (Ds)	1937,84±11,067	1935,40 ±10,381	0,334
Edad del diagnóstico(años),media (Ds)	59,42±9,197	62,22±10,456	0,263
Año del diagnóstico, media (Ds)	1997,26 ±7,866	1997,65 ±8,348	0,846
Clínica: sintomáticos	9 (47,4%)	46(25,4%)	0,121
Múltiplos de FAT, media (Ds)	5,11±4,52	3,60±3,29	0,049
Distribución gammagráfica:			
Monostótico	6 (31,6%)	86 (47,5%)	
Poliostótico	13 (68,4%)	95(52,5%)	0,139
Numero de localizaciones,media (Ds)	3,42 ±2,364	2,34 ±2,077	0,035
Tratamiento con BF, n(%)	10 (52,6%)	82 (45,3%)	0,208
Número de tratamientos, media (Ds)	2,18 ±1,6632	1,29 ±1,224	0,028
Número de complicaciones, media (Ds)	1,84±1,167	1,27±1,158	0,040
Complicaciones asociadas a la evolución de la enfermedad:			
-Artropatía por vecindad, n (%)	15 (78,9%)	97 (53,6%)	0,028
-Sordera/Paget craneal, n (%)	3 (15,8%)	23 (12,7%)	0,462
-Deformidad, n (%)	14 (73,7%)	88 (48,6%)	0,032
-Fractura y prótesis, n (%)	3 (15,8%)	21 (11,6%)	0,405

5.2.1. Estudio de asociación de polimorfismos en el gen *TNFRSF11A* (*RANK*) y en el gen *TNFRSF11B* (*OPG*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget.

Para el análisis de asociación de los diferentes polimorfismos en el gen *TNFRSF11A* (*RANK*) y en el gen *TNFRSF11B* (*OPG*) se genotiparon 200 pacientes con el diagnóstico de EOP confirmado y 200 controles hipernormales pareados por edad, sexo, etnia, región geográfica y origen de sus ancestros sin presentar antecedentes de enfermedades óseas. Las muestras de DNA procedían del banco nacional de DNA-Salamanca.

En el presente estudio se genotipo un total de 21 polimorfismos presentes en los genes *TNFRSF11A* (*RANK*) y *TNFRSF11B* (*OPG*). Del total de polimorfismos seleccionados inicialmente, ninguno de ellos fue excluido por no superar el control de calidad establecido. En el estudio se analizó el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (*HWE*) para cada variante considerando a toda la población de estudio. Todos los SNPs genotipados se encontraban en equilibrio de *HWE* con un nivel de significancia mayor al 5%.

5.2.1.1. Estudio de asociación de polimorfismos en el gen *TNFRSF11A* (*RANK*) en pacientes afectados de enfermedad ósea de Paget. Correlación genotipo-fenotipo.

Se genotiparon 10 polimorfismos previamente seleccionados de acuerdo con la información obtenida de diferentes bases de datos públicas ampliamente utilizadas y cumpliendo los criterios de selección establecidos. La descripción de los polimorfismos seleccionados y posteriormente genotipados, mediante la tecnología MassARRAY®iPLEX Gold (Sequenom®), se describen en la tabla 25.

En el análisis de asociación de las siguientes variantes polimórficas seleccionadas en el gen *TNFRSF11A* y en función de los diferentes modelos de herencia genéticos, se objetivó que las variantes rs1805034 y rs3018362 se encontraban asociadas a la EOP siguiendo el modelo dominante, en ambos casos. Otra variante con valor de significancia estadística en el estudio de asociación es la variante rs6567274, pero en este caso, presenta una asociación en función del modelo recesivo. Por consiguiente y en función del estudio de asociación (Odds ratio) las siguientes variantes descritas (rs1805034, rs3018362 y rs6567274) pueden considerarse como posibles marcadores de riesgo para la EOP, siendo el valor de la Odds ratio un indicador de aumento o disminución de riesgo a presentar la EOP (tabla 25)

Tabla 25. Descripción de los polimorfismos genotipados en el gen *TNFRSF11A* y análisis del riesgo en función del modelo de herencia. Identificación de SNPs, localización, eficiencia del genotipado, Frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor), Odds Ratio (IC 95%), p-valor (modelo herencia genéticos).

SNP ID	Chr: Posición SNP (locus)	Localización	Eficiencia del genotipado	Alelo (Minor/Major)	MAFs	HWE (p-valor)	p-valor	OR (CI 95%)	p-valor codominante/dominante/recesivo/overdominante/"log-additive"				
rs11152341	18:59996297	Intron 1	95.29	G/A	0.20	0.403	0.12361	0.71 [0.46-1.10]	0.26450	0.21452	0.46759	0.12361	0.39294
rs12150741	18:59998525	Intron 1	95.29	C/T	0.20	0.709	0.19517	0.75 [0.49-1.16]	0.43206	0.23493	0.84912	0.19517	0.33890
rs12457042	18:59993453	Intron 1	98.76	T/A	0.06	0.089	0.34107	0.77 [0.43-1.39]	0.34107	0.63266	0.24810	0.98690	0.34107
rs4436867	18:60003644	Intron 1	99.01	A/C	0.20	0.418	0.26621	0.82 [0.57-1.17]	0.49943	0.23874	0.79205	0.26929	0.26621
rs6567274*	18:60037800	Intron 9	98.76	T/G	0.29	0.057	0.00003	0.22 [0.10-0.48]	0.00012	0.5039	0.00003	0.0633	0.01943
rs7233197	18:59997434	Intron 1	99.26	T/C	0.07	0.555	0.20532	0.98 [0.58-1.65]	0.20532	0.72678	0.24815	0.42524	0.20532
rs8092336	18:60036083	Exon 9	98.76	A/G	0.04	0.465	0.70515	1.16 [0.54-2.51]	0.70515	-	-	-	-
rs1805034*	18:60027241	Exon 6	100	C/T	0.46	0.146	0.03761	1.58 [1.02-2.42]	0.0442	0.0063	0.49150	0.02407	0.27814
rs3018362*	18:60082093	3' near gene	99.01	A/G	0.35	0.789	0.01332	1.66 [1.11-2.48]	0.0232	0.0137	0.3262	0.0726	0.02240
rs8086340	18:60006978	Intron 1	98.76	C/G	0.47	0.318	0.14068	0.72 [0.47-1.12]	0.33048	0.14068	0.74300	0.28866	0.26394

*Los polimorfismos que alcanzaron la significación estadística en el estudio de asociación, se detallan en negrita

En el estudio del polimorfismo RANKrs1805034 hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica entre pacientes con EOP y controles. Ser portador del genotipo CC y CT del polimorfismo RANKrs1805034 se asoció con un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad, confirmando este resultado en los modelos codominante, dominante y overdominante. Asimismo se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica, ser portador del alelo C del polimorfismo RANKrs1805034 aumenta el riesgo a desarrollar EOP (tabla 26).

Tabla 26. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs1805034.

	Pacientes (n:200)	Controles (n:200)	p-valor	OR (IC95%)
Genotipo				
Codominante				
TT	46 (23%)	71 (35.5%)	0.0075	1.00
CT	100 (50%)	81 (40.5%)		1.91 (1.19-3.06)
CC	54 (27%)	48 (24%)		0.0442
Recesivo				
TT+CT	146 (73%)	152 (76%)	0.49150	1.00
CC	54 (27%)	48 (24%)		1.17(0.75-1.84)
Dominante				
TT	46 (23%)	71 (35.5%)	0.00630	1.00
CC+CT	154 (77%)	129(64.5%)		1.84 (1.19-2.86)
Overdominante				
TT+ CC	100 (50%)	119(59.5%)	0.02407	1.00
CT	100 (50%)	81 (40.5%)		1.47(0.99-2.18)
Alelos				
T	192(48%)	223 (55.8%)	0.0120	1.00
C	208(52%)	177 (44.2%)		1.43(1.08-1.88)

En el estudio del polimorfismo RANKrs1805034 observamos una interacción con la mutación SQSMT1 P392L+ (tabla 27). Identificamos que ser portador del genotipo CT y CC y del alelo C y de la mutación SQSMT1 P392L+, incrementaba el riesgo (OR (CI95%) 1.89 [1.16-3.10]) a presentar EOP. Esta OR más elevada, no se observa en el subgrupo de pacientes afectados EOP portadores de las distintas mutaciones del gen *SQSMT1* descritas en nuestro estudio, respecto a los controles. Por consiguiente, ser portador del alelo C, aumentaba el riesgo un 43% de presentar EOP, siendo este riesgo mayor, un 89% si se asocia a la presencia de mutación SQSMT1 P392L+.

Tabla 27. Distribución genotípica y alélica en los diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos y controles) en el estudio del polimorfismo RANKrs1805034.

	Frecuencia alélica			p-valor	OR	(CI 95%)	Frecuencia genotípica			p-valor
	n	T	C				TT	CT	CC	
Controles	200	223 (55.8%)	177 (44.2%)				71 (35.5%)	81 (40.5%)	48 (24%)	
Pacientes EOP(total)	200	192(48%)	208(52%)	0.0120	1.43	(1.08-1.88)	46 (23%)	100 (50%)	54 (27%)	0.0214
EOP SQSMT1 positivo	54	54 (50%)	54 (50%)	0.2875	1.26	(0.83-1.93)	14 (26%)	26 (48%)	14 (26%)	0.4026
EOP SQSMT1 P392L	40	32 (40%)	48 (60%)	0.0107	1.89	(1.16-3.10)	6 (15%)	20 (50%)	14 (35%)	0.0361
EOP SQSMT1 negativo	146	137(47%)	155(53%)	0.0218	1.41	(1.02-1.93)	32 (22%)	74 (51%)	40 (27%)	0.0227

La distribución genotípica del polimorfismo RANKrs1805034, en función de las diferentes variables clínico-demográficas, en la población de EOP, se describen en la tabla 28. Ser portador del genotipo CC, se asoció significativamente con pacientes que presentan una mayor actividad de la enfermedad con mayores niveles de múltiplos de FA al diagnóstico, así como ser portador del genotipo CT se asoció con pacientes que presentaban una mayor extensión de la enfermedad con un mayor número de localizaciones óseas afectadas al diagnóstico y un porcentaje mayor de casos poliostóticos, así como un mayor número de complicaciones siendo la deformidad las más frecuentemente asociada. Por consiguiente, ser portador del alelo C se asocio a una mayor extensión de la enfermedad y a un mayor actividad de la misma al diagnóstico así como mayores complicaciones durante el curso de la EOP, mostrando significación estadística.

Tabla 28. Distribución genotípica del polimorfismo RANKrs1805034 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

	RANKrs1805034			p-valor
	CC (n:46)	CT (n:100)	TT (n:54)	
Edad al diagnóstico	61.43±11.29	62.13±10.20	61.96±10.12	0.332
Múltiplos de FA	4.34±4.43	3.90±3.57	2.90±1.74	0.015
Número de localizaciones	2.41±2.18	2.55±2.35	2.01±1.61	0.045
Número de complicaciones	1.32±1.24	1.42±1.16	1.06±1.10	0.001
Género F (n=91) M(n=109)	19(20%) 25 (22.9%)	50(54.9%) 52(47.7%)	21(23.1%) 30(27.5%)	0.761
Historia Familiar positiva	3 (15.8%)	13(68.4%)	2(10.5%)	0.142
Distribución gammagrafica Monostótico (n=81) Poliostóticos(n=119)	8 (9.8%) 38(31.3%)	44(54.3%) 56(47%)	29 (35.8%) 25(21.7%)	0.005
Tratamiento con BF (n=92)	25(27.2%)	47(51.1%)	18(19.6%)	0.315
Artropatía por vecindad (n=112)	23(20.5%)	62(55.4%)	24(21.4%)	0.097
Sordera, Paget craneal (n=26)	8(30.8%)	13(50%)	5(19.2%)	0.581
Deformidad (n=102)	23(22.5%)	56(54.9%)	20(19.6%)	0.045
Fractura y prótesis (n=24)	4(16.7%)	14(58.3%)	5(20.8%)	0.539
Clínica: Sintomático (n=55)	12(21.8%)	29(52.7%)	13(23.6%)	0.998

Este polimorfismo no sinónimo del gen *TNFRSF11A* se caracteriza por presentar un cambio de valina a alanina en el codón 192 (V192A) localizado en el exón 6. En el estudio de conservación interespecie de diversos organismos, se observó que V192 es un aminoácido conservado evolutivamente en mamíferos, lo que sugiere una implicación importante en la función de la proteína RANK.

<i>Homo sapiens</i> (Human)	LGKRVEHHGTEKSDVVCSSSLPARKPPNEPHVYLP
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	LGKLEAHQGTTESDVCSSSMTLRRPPKEAQAYLP
<i>Pongo abelii</i> (Sumatran orangutan)	LGKTVEHHGTEKSDVVCSSSLPARKPPNEPYVYLP
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	LGKMEAHQGTTESDVCSSSLTLIKPPKEAQVYLP
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	LGETEARGHTDKSDVVCSSSLPSTKPPNEPQTYLP
<i>Canis lupus familiaris</i> (Dog)	LGKEKVRHGTDKSDVVCSSSLPSTKPPKEPQIYLP
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (Giant panda)	LGETEVEHHGTDKSDVVCSSSLPSAKPPKEPQIYLP
<i>Nomascus leucogenys</i> (Northern white-cheeked gibbon)	LGKTVEHHGTEKSDVVCSSSLPARKPPNEPHVYLP

Figura 25. Estudio de la conservación aminoacídica interespecies para el polimorfismo RANK rs1805034 p.V192A

El resultado del estudio de predicción del posible impacto del polimorfismo “*in silico*” mediante la implementación de herramientas bioinformáticas como SIFT y Polyphen-2, clasifica a RANKrs1805034 como “Seguramente perjudicial” por Polyphen-2 y “Deletéreo” por SIFT. Así como, el resultado del análisis funcional de la proteína “*in silico*” mediante la herramienta bioinformática InterPro, identificó a la variante genética en una posición extracelular de la proteína RANK en el dominio de pseudorrepetición rico en cisteína (TNF_CYS_RICH_REG, CDR), dentro del dominio CDR4. Sin embargo, se ha observado que el dominio CDR4, no regula físicamente la interacción específica entre el ligando y el receptor, es decir entre RANKL y RANK, pero su importancia radica en mantener la integridad estructural del receptor y regular la transmisión de información al interior celular, por consiguiente variaciones genéticas en esta región podrían favorecer cambios conformacionales locales y funcionales de la proteína RANK con implicaciones en la osteoclastogénesis.

El polimorfismo RANKrs3018362 se sitúa en la región intergénica, en una posición localizada en el extremo 3', en la región downstream del gen *TNFRSF11A*. En relación al análisis de asociación del polimorfismo del gen RANKrs3018362 en la población EOP respecto a la población control, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica entre pacientes con EOP y controles, en función de los diferentes modelos de herencia genéticos: dominante, codominante y en el modelo “log-additive”. Ser portador del genotipo GA del polimorfismo RANK rs3018362 se asoció con un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad. También se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica, ser portador del alelo A del polimorfismo RANK rs3018362 aumenta el riesgo a desarrollar EOP respecto a los controles, con un riesgo estimado del 43% (tabla 29).

Tabla 29. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs3018362.

	Pacientes (n:196)	Controles (n:200)	p-valor	OR (IC95%)
Genotipo				
Codominante				
GG	71 (36.2%)	97 (48.5%)	0.0232 0.0886	1.00
GA	97 (49.5%)	81 (40.5%)		1.64(1.07-2.50)
AA	28 (14.3%)	22 (11%)		1.74(0.92-3.29)
Recesivo				
GG+GA	168 (85.7%)	178 (76%)	0.3262	1.00
AA	28 (14.3%)	22 (11%)		1.35 (0.74-2.45)
Dominante				
GG	71 (36.2%)	97 (48.5%)	0.0137	1.00
GA+AA	125(63.8%)	103(51.5%)		1.66 (1.11-2.48)
Overdominante				
AA+ GG	99 (50.5%)	119(59.5%)	0.0726	1.00
GA	97 (49.5%)	81 (40.5%)		1.44(0.97-2.14)
Alelos				
G	239(61%)	276 (69%)	0.0180	1.00
A	153(39%)	124 (31%)		1.43(1.10-1.92)

En el estudio del polimorfismo RANKrs3018362 no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica en los diferentes subgrupos analizados como los pacientes portadores de la mutación SQSMT1 P392L+ y los pacientes portadores de todas las mutaciones SQSMT1 descritas en nuestra población respecto a la población control. En este caso, el efecto del polimorfismo sobre el riesgo de EOP solo aparece en aquellos individuos con SQSMT1 negativo, con un riesgo estimado del 41%. Por consiguiente, la asociación a la mutación SQSMT1 del polimorfismo RANKrs3018362 no aumentaría el riesgo a desarrollar EOP, lo que nos sugiere que esta variante tiene un menor impacto sobre la patología mientras que el hecho de tener una mutación en el SQSMT1 prevalecería el efecto de dicha mutación (tabla 30).

Tabla 30. Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs3018362.

	Frecuencia alélica			p-valor	OR	(CI95%)	Frecuencia genotípica			p-valor
	n	G	A				GG	GA	AA	
Controles	200	276 (69%)	124 (31%)				97 (48.5%)	81 (40.5%)	22 (11%)	
Pacientes EOP (total)	196	239 (61%)	153 (39%)	0.0180	1.43	(1.10-1.92)	71 (36.2%)	97 (49.5%)	28 (14.3%)	0.0464
EOP SQSMT1 positivo	54	65 (60.2%)	43 (39.8%)	0.0846	1.47	(0.95-2.29)	19 (35.2%)	27 (50%)	8 (14.8%)	0.2147
EOP SQSMT1 P392L	40	52 (65%)	28 (35%)	0.4830	1.20	(0.72-1.99)	16 (40%)	20 (50%)	4 (10%)	0.5334
EOP SQSMT1 negativo	142	174 (61.3%)	110 (38.7%)	0.0360	1.41	(1.02-1.94)	52 (36.6%)	70 (49.3%)	20 (14.1%)	0.0417

La distribución genotípica del polimorfismo RANKrs3018362, en función de las diferentes variables clínico-demográficas, en la población de EOP, se describe en la tabla 31. Se observaron diferencias estadísticamente significativas, ser portador del genotipo GA, se asoció con pacientes que presentan una menor edad al diagnóstico de la enfermedad, mayor número de localizaciones, mayor actividad de la enfermedad en función de los niveles más elevados de múltiplos de FA, así como un mayor número de tratamiento realizados.

Tabla 31. Distribución genotípica del polimorfismo RANKrs3018362 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

	Rs3018362			p-valor
	AA(n:28)	GA(n:97)	GG (n:71)	
Edad al diagnóstico	62.21±11.90	60.35±10.31	63.90±9.67	0.044
FAT al diagnóstico	421.71±577.46	538.33±485.65	427.96±315.11	0.043
Múltiplos de FAT	3.50±4.34	4.17±3.76	3.30±2.46	0.043
Número de localizaciones	2.55±1.75	2.61±2.50	2.30±1.72	0.049
Número de complicaciones	1.32±1.25	1.22±1.19	1.42±1.12	0.147
Género				
F (n=91)	15(16.5%)	40(44%)	35(38.5%)	0.469
M(n=109)	13(11.9%)	57(52.3%)	36(33%)	
Historia Familiar positiva(n=19)	2(10.5%)	9(47.4%)	7(36.8%)	0.796
Distribución gammagrafica				
Monostótico (n=92)	12(13%)	46(51%)	33(36%)	0.824
Poliostóticos (n=108)	16(15%)	51(50%)	38 (35%)	
Tratamiento con BF (n=92)	25(27%)	45(49%)	22(24%)	0.029
Artropatía por vecindad (n=108)	15(14%)	50(46.3%)	43(39.7%)	0.204
Sordera, Paget craneal (n=26)	2(7.7%)	17(65.4%)	7(26.9%)	0.281
Deformidad (n=99)	15(15.2%)	42(42.4%)	42(42.4%)	0.159
Fractura y prótesis (n=23)	5(21.8%)	9(39.1%)	9(39.1%)	0.520
Clínica: Sintomático (n=53)	9(17%)	28(52.8%)	16(30.2%)	0.425

En función de los algoritmos de predicción funcionales “*in silico*”, se ha observado que el alelo A del polimorfismo rs3018362 se asocia a un cambio funcional del factor de transcripción NFATc1 (células T activadas por factor nuclear c1). Este factor de transcripción, juega un papel importante en la diferenciación de los osteoclastos, mediante la regulación de una serie de genes específicos de los osteoclastos (TRAP, catepsina K, receptor de calcitonina y receptor asociado a osteoclastos (OSCAR)). Por consiguiente, variaciones genéticas como el polimorfismo rs3018362 que influyan en la regulación de NFATc1 en los osteoclastos puede alterar la diferenciación de los mismos y por ende, favorecer una osteoclastogénesis defectuosa, base patogénica del desarrollo de la EOP.

Otra de las variantes que ha presentado asociación significativa con la población de EOP respecto a los controles, es el polimorfismo rs6567274, localizado en la región intrónica del gen *TNFRSF11A*, donde ser portador del genotipo TT del polimorfismo RANKrs6567274 se asoció con una disminución de riesgo a desarrollar la enfermedad, confirmando este resultado en los modelos codominante, “log-additive” y recesivo. Asimismo se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica, ser portador del alelo T del polimorfismo RANKrs6567274 se asociaba a una disminución del riesgo a desarrollar EOP (tabla 32).

Tabla 32. Distribución genotípica y alélica entre pacientes y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs6567274.

	Pacientes (n:195)	Controles (n:200)	p-valor	OR (IC95%)
Genotipo				
Codominante				
GG	106 (54.4%)	102 (51%)		1.00
GT	81 (41.5%)	65 (32.5%)	0.4021	1.19(0.78-1.83)
TT	8 (4.1%)	33 (16.5%)	0.0005	0.23(0.10-0.53)
Recesivo				
GG+GT	187(95.9%)	167 (83.5%)		1.00
TT	8 (4.1%)	33 (16.5%)	0.0002	0.22 (0.10-0.48)
Dominante				
GG	106 (54.4%)	102 (51%)		1.00
GT+TT	89 (45.6%)	98(49%)	0.5039	0.87 (0.58-1.30)
Overdominante				
GG+TT	114 (58.5%)	135(67.5%)		1.00
GT	81 (41.5%)	65 (32.5%)	0.0633	1.47(0.98-2.23)
Alelos				
G	293(75.2%)	269 (67.3%)		1.00
T	97(24.8%)	131 (32.7%)	0.014	0.68(0.49-0.93)

En el estudio del polimorfismo RANKrs6567274 encontramos una interacción con ser portador de mutaciones en el gen del SQSMT1. Por consiguiente ser portador del alelo T en los diferentes subgrupos analizados como la población de EOP, pacientes portadores de SQSMT1 P392L positivo y pacientes portador de SQSMT1 positivo se

asociarían a un menor riesgo de presentar la enfermedad, incluso la asociación entre el polimorfismo RANKrs6567274 y ser portador de la mutación SQSMT1 presentarían una Odds ratio mayor, por consiguiente esta protección frente a desarrollar la enfermedad sería mayor, mostrando significación estadística en todos los subgrupos analizados (tabla 33).

Tabla 33. Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo RANKrs6567274.

	Frecuencia alélica			p-valor	OR	(CI95%)	Frecuencia genotípica			p-valor
	n	G	T				GG	GT	TT	
Controles	200	269 (67.3%)	131 (32.7%)				102 (51%)	65 (32.5%)	33 (16.5%)	
Pacientes EOP(total)	195	293 (75.2%)	97 (24.8%)	0.0148	0.68	0.33-0.92	106 (54.4%)	81 (41.5%)	8 (4.1%)	0.0002
EOP SQSMT1 positivo	54	85 (78.7%)	23 (21.3%)	0.0228	0.56	0.2386 - 0.9462	34 (63%)	17 (31.5%)	3 (5.6%)	0.0933
EOP SQSMT1 P392L	40	63 (78.7%)	17 (21.3%)	0.0441	0.55	0.32-0.98	26 (65%)	11 (27.5%)	3 (7.5%)	0.1932
EOP SQSMT1 negativo	141	208 (73.7%)	74 (26.3%)	0.0684	0.73	0.52 - 1.02	72 (49.3%)	64 (43.8%)	5 (3.4%)	0.0003

La distribución genotípica del polimorfismo RANKrs6567274, en función de las diferentes variables clínico-demográficas, en la población de EOP, se describen en la tabla 34. Ser portador del genotipo TT, se asoció con pacientes que presentan una mayor edad al diagnóstico de la enfermedad, así como menor número de complicaciones durante el curso de la enfermedad siendo la artropatía por vecindad, la complicación que menos se asocia a la EOP, mostrando significación estadística. Por consiguiente, el ser portador del genotipo TT, se asocia a un menor riesgo de desarrollar EOP, o incluso a presentarla a una edad más avanzada y con menores complicaciones durante el curso de la enfermedad, mostrando una menor presencia de artropatía por vecindad en los portadores del polimorfismo RANKrs6567274.

Tabla 34. Distribución genotípica del polimorfismo RANK rs6567274 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

	RS6567274			p- valor
	GG(n:106)	GT(n:81)	TT (n:8)	
Edad al diagnóstico	61.08±11.37	62.72±9.11	64.75±8.82	0,025
FAT al diagnóstico	500.69±452.75	463.15±453.84	424±272.94	0.521
Múltiplos de FA	3,87±3.52	3.59±3.52	3.28±2.12	0.521
Número de localizaciones	2.49±2.34	2.38±1.95	2.50±1.41	0.576
Número de complicaciones	1.38±1.17	1.22±1.74	1.01±1.28	0.045
Género				
F (n=91)	49(54%)	39(43%)	2(3%)	0.404
M(n=105)	57(54.3%)	42(40%)	6(5.7%)	
Historia Familiar positiva (n=18)	11(58%)	7(42%)	0(0%)	0.520
Distribución gammagrafica				
Monostótico (n=91)	51(13%)	37(51%)	3(36%)	0.618
Polioestóticos (n=104)	55(52.9%)	44(42.3%)	5 (4.8%)	
Tratamiento con BF (n=88)	51(58%)	34(38.6%)	3(3.4%)	0.660
Artropatía por vecindad (n=107)	63(58.9%)	41(38.3%)	3(2.8%)	0.039
Sordera, Paget craneal (n=26)	12(46.2%)	12(46.2%)	2(7.7%)	0.519
Deformidad (n=99)	59(59.5%)	37(37.4%)	3 (3.1%)	0.460
Fractura y prótesis (n=23)	12(52.2%)	9(39.1%)	2(8.7%)	0.639
Clínica: Sintomático (n=53)	32(60.4%)	18(34%)	3(5.6%)	0.708

Estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipos en el gen *TNFRSF11A* (RANK)

El estudio de desequilibrio de ligamiento y el establecimiento de los bloques haplotípicos a partir de los SNP seleccionados se llevó a cabo mediante la herramienta Haploview y la librería haplo.stats implementada dentro de SNPassoc del software R [www.r-project.org]. El estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipos permite observar grupos de variantes dependientes entre sí, es importante su detección, ya que muchas de las propiedades exigidas a las variantes en un estudio de asociación es la independencia. En nuestro estudio no se observó desequilibrio de ligamiento entre las diferentes variables estudiadas en este gen *TNFRSF11A*, así como no se detectaron haplotipos estadísticamente significativos entre nuestras variantes seleccionadas en el gen *TNFRSF11A* y no se establecieron haplotipos con las variantes estudiadas.

5.2.1.2. Estudio de asociación de polimorfismos en el gen *TNFRSF11B* (*OPG*) en pacientes afectados de enfermedad ósea de Paget. Correlación genotipo-fenotipo.

En relación al estudio de asociación de polimorfismos del el gen *TNFRSF11B* (*OPG*) en pacientes afectados de EOP, se genotiparon 11 polimorfismos previamente seleccionados de acuerdo con diferentes bases de datos públicas ampliamente utilizadas. La descripción de los polimorfismos genotipados y el estudio de asociación genético entre la población EOP y los controles, se describen la tabla 35.

Tabla 35. Descripción de los polimorfismos genotipados en el gen *TNFRSF11B* y análisis del riesgo en función del modelo de herencia. Identificación de SNPs, localización, Eficiencia del genotipado, Frecuencia del alelo menor (MAF), Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE p-valor), Odds Ratio (IC 95%), p-valor (modelo de herencia).

SNP ID	Chr: Posición	Localización	Eficiencia de genotipado	Alelos (Minor/Major)	MAFs	HWE (p- valor)	p-valor	OR (CI 95%)	p-valor codominante/dominante/recesivo/overdominante/log-additive
rs1032129	8:119951900	Intron 1	96.03	C/A	0.36	0.907	0.06362	0.75 [0.56-1.02]	0.17899 0.09776 0.18771 0.44419 0.06362
rs11573869	8:119953158	Intron 1	98.51	C/T	0.10	0.106	0.79917	1.01 [0.62-1.65]	0.79917 0.85974 1.00000 0.76065 0.79917
rs11573871*	8:119952765	Intron 1	99.01	A/G	0.11	0.534	0.00983	3.20 [1.24-8.24]	0.00983 - - - -
rs1485286	8:119950668	Intron 1	99.01	C/T	0.28	0.464	0.17191	0.80 [0.58-1.10]	0.39056 0.22763 0.33369 0.47622 0.17191
rs1564858	8:119945166	Intron 2	98.76	A/G	0.10	0.239	0.26788	0.76 [0.46-1.24]	0.53409 0.26788 0.99714 0.26296 0.28701
rs2073617	8:119964283	5' UTR	99.26	C/T	0.49	0.332	0.70755	1.03 [0.70-1.53]	0.92839 0.70755 0.84048 0.87449 0.72037
rs2073618	8:119964052	Exon 1	99.26	G/C	0.50	0.581	0.24632	0.79 [0.53-1.18]	0.49003 0.66528 0.37086 0.24632 0.78023
rs3102735	8:119965070	5' near gene (promoter region)	99.01	C/T	0.15	0.584	0.25892	0.87 [0.48-1.57]	0.52370 0.25892 0.70247 0.29922 0.26010
rs3134069	8:119964988	5' near gene (promoter region)	99.01	C/A	0.07	0.562	0.54487	0.83 [0.46-1.51]	0.65026 0.65258 1.00000 0.54487 0.65026
rs3134070	8:119965024	5' near gene (promoter region)	99.01	T/A	0.07	0.562	0.54487	0.83 [0.46-1.51]	0.65026 0.65258 1.00000 0.54487 0.65026
rs6415470	8:119955111	Intron 1	95.04	G/A	0.42	0.579	0.23775	0.78 [0.52-1.17]	0.36570 0.81532 0.21733 0.23775 0.60365

*Los polimorfismos que alcanzaron la significación estadística en el estudio de asociación, se detallan en negrita

En el análisis de asociación de las siguientes variantes polimórficas seleccionadas en el gen *TNFRSF11B* (OPG), y en función de los diferentes modelos de herencia genéticos, se objetivó que la única variante genética que se encontraba asociada a la enfermedad EOP es el polimorfismo OPG rs11573871 en el modelo codominante, respecto a los controles. Cabe destacar que debido a la falta de representación del genotipo AA en nuestra población de pacientes de EOP como controles, ha dificultado la realización del estudio de asociación con los diferentes modelos de herencia.

En el estudio del polimorfismo del gen OPG rs11573871 (A>G), situado en la región intrónica (Intrón 1) del gen *TNFRSF11B*, hemos observado que ser portador del genotipo AG del polimorfismo OPG rs11573871 se asoció con un aumento de riesgo a desarrollar la enfermedad, confirmando este resultado en el modelo codominante, respecto a los portadores del genotipo GG. Asimismo se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica, ser portador del alelo A del polimorfismo OPG rs11573871 se asociaba a un aumento del riesgo a desarrollar EOP (tabla 36).

Asimismo, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo OPG rs11573871 en los diferentes subgrupos analizados de la población EOP respecto a los controles. Sin embargo, en relación a la distribución alélica, el ser portador del alelo A, se asocia a un aumento de riesgo de presentar EOP respecto a los controles, siendo estadísticamente significativa, a pesar que este riesgo asociado a desarrollar EOP no se incrementa cuando se asocia la presencia de la mutación SQSMT1 positiva, únicamente se hace evidente en la población SQSMT1 negativo. Esto sugiere que mutaciones en el gen *SQSMT1* tienen un mayor efecto sobre el fenotipo que enmascararía el efecto más leve del polimorfismo OPGrs11573871.

Tabla 36. Distribución genotípica y alélica entre pacientes diferentes subgrupo de pacientes (EOP SQSMT1 positivos, EOP SQSMT1 P392L positivos, EOP SQSMT1 negativos) y controles en el estudio del polimorfismo OPGrs11573871.

	Frecuencia alélica			p-valor	OR	(CI95%)	Frecuencia genotípica			p-valor
	n	G	A				GG	AG	AA	
Controles	198	390 (98.5%)	6 (1.5%)				192 (97%)	6 (3%)	0 (0%)	
Pacientes EOP(total)	198	378 (95.5%)	18 (4.5%)	0.0178	3.09	1.22-7.88	180 (91%)	18 (9%)	0 (0%)	0.0116
EOP SQSMT1 positivo	54	103 (95%)	5 (5%)	0.0619	3.16	0.94-10.54	49 (90.7%)	5 (9.3%)	0 (0%)	0.0475
EOP SQSMT1 P392L	40	76 (95%)	4 (5%)	0.0614	3.42	0.94 -12.41	36 (90%)	4 (10%)	0 (0%)	0.0455
EOP SQSMT1 negativo	144	275 (95.5%)	13 (4.5%)	0.0247	3.07	1.15 - 8.18	131 (91%)	13 (9%)	0 (0%)	0.0170

La distribución genotípica del polimorfismo OPG rs11573871, en función de las diferentes variables clínico-demográficas, en la población de EOP, se describen en la tabla 37. Se observó que ser portador del genotipo AG, se asoció con pacientes que presentan menores valores de múltiplos de FA y ausencia de casos de Paget craneal. Por consiguiente ser portador del genotipo AG podría influir en presentar una menor actividad de la enfermedad, e incluso la no afectación de la localización craneal, respecto al genotipo GG.

Tabla 37. Distribución genotípica (GG/AG) del polimorfismo OPG rs11573871 en función de distintas variables clínico-demográficas en la población de pacientes EOP.

	rs11573871		
	GG(n:180)	AG(n:18)	p-valor
Edad al diagnóstico	62.05±10.50	60.17±9.23	0.424
Múltiplos de FA	3,83±3.57	2.79±1.36	0.031
Número de localizaciones	2.44±2.15	2.56±2.04	0.889
Número de complicaciones	1.33±1.18	1.17±1.09	0.436
Género			
F (n=90)	83(91.2))	7(8.8%)	
M(n=108)	97(89%)	11(11%)	0.835
Historia Familiar positiva (n=19)	17(90%)	2(10%)	0.876
Distribución gammagrafica			
Monostótico (n=91)	84(92%)	7 (8%)	
Poliosotóticos (n=107)	96(90%)	11 (10%)	0.814
Tratamiento con BF (n=91)	83(91%)	8(9%)	0.872
Artropatía por vecindad (n=110)	99(89%)	11(11%)	0.399
Sordera, Paget craneal (n=26)	26 (100%)	0(0%)	0.043
Deformidad (n=100)	92(92%)	8(8%)	0.328
Fractura y prótesis (n=24)	22(92%)	2(8%)	0.863
Clínica: Sintomático (n=55)	47(85.5%)	8(14.5%)	0.422

El polimorfismo OPG rs11573871 afecta a la región intrónica (Intrón 1) del gen *TNFRSF11B* en todas sus isoformas. En base a los algoritmos de predicción funcional “*in silico*”, se ha observado que el cambio del alelo G por A del polimorfismo rs11573871 favorece la generación de un posible patrón de splicing que es reconocido por una proteína reguladora del RNAm, Qk1, implicada en procesos de diferenciación celular, mostrando significación estadística. Sin embargo, el reconocimiento del sitio de splicing por la proteína Qk1, no se efectúa cuando se encuentra el alelo ancestral, dado que no se encuentra dicha localización en la secuencia original. Por consiguiente, la posibilidad de generar un posible patrón splicing, modificando la estabilidad del RNA, podría favorecer una alteración en la proteína OPG, dando lugar a una proteína no funcional y por consiguiente incrementar el riesgo de presentar EOP.

Estudio de desequilibrio de ligamiento y haplotipos

En nuestro estudio no se observaron desequilibrio de ligamiento entre las diferentes variables polimórficas estudiadas en el gen *TNFRSF11B* (OPG), así como no se detectaron haplotipos estadísticamente significativos entre nuestras variantes asociadas a EOP.

5.2.1.3. Estudio de epistasia. Interacciones entre polimorfismos asociados a la enfermedad ósea de Paget.

El estudio de epistasia nos va a permitir el estudio de la interacción entre diferentes variables genéticas independientes en la determinación de un determinado fenotipo, con el objetivo de explicar gran parte de la variación fenotípica que muestran las enfermedades complejas, así como identificar las variables genéticas que están relacionadas o influyen o modulan el efecto de otras variables, contribuyendo en el riesgo de padecer una determinada enfermedad. Los resultados obtenidos al utilizar la librería “SNPassoc” [<http://cran.r-project.org/web/packages/SNPassoc/index.html>] del software R versión 2.15.0 para Windows [www.r-project.org], en función de las interacciones entre los diferentes polimorfismos se muestran en forma de matriz, donde las celdas corresponden a los p-valores obtenidos para cada par de SNPs evaluados y se representan mediante colores, el verde oscuro significa un valor de p-valor por debajo de 0,01. En el gráfico, la diagonal muestra el p-valor para el SNP individual, en la parte inferior se muestra en qué medida el modelo de la combinación de SNPs supera al modelo de los dos individuales y en la parte superior se muestra la significación del término de interacción para ese par de SNPs.

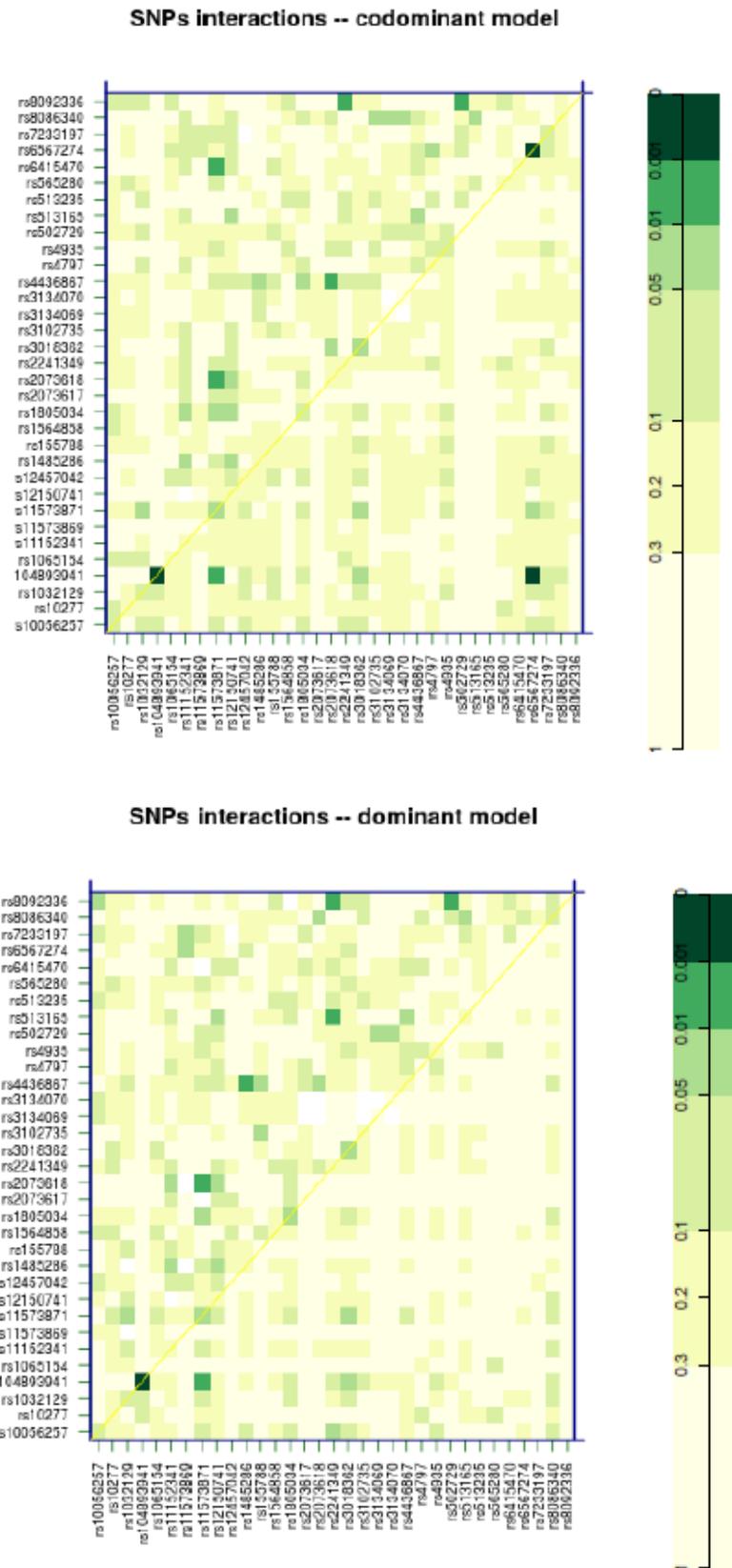


Figura 26. Estudio de epistasia entre todas las pares de variantes a estudio en modelo codominante y dominante. El triángulo inferior indica la significancia estadística. El triángulo superior indica los valores de inferencia bayesiano. En el presente trabajo se consideró la significancia estadística como valor determinante, con un valor umbral de 0,01.

Los SNPs incluidos en el estudio de epistasia fueron: rs1805034 (*RANK*), rs3018362 (*RANK*), rs6567274 (*RANK*), rs11573871 (*OPG*), rs104893941 (*SQSMT1*), aquellos correspondientes a los que se observó una asociación estadísticamente significativa en relación al riesgo de desarrollar EOP. En relación al estudio de las distintas interacciones entre los diferentes polimorfismos, se ha identificado un incremento de riesgo mayor a desarrollar EOP, el ser portador del alelo C del polimorfismo RANK rs1805034 y del alelo A del polimorfismo OPG rs 11573871 respecto al riesgo condicionado de ser portador de un único polimorfismo de riesgo (tabla 38).

Tabla 38. Distribución alélica entre pacientes y controles del estudio de interacciones de los polimorfismos RANK rs1805034 y OPG rs11573871.

SNP	Alelos	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC95%)
RANK rs1805034/OPG rs 11573871	T/G	188 (52.2%)	209 (54.4%)	0.0022	1.00 10.01(2.29-43.69)
RANK rs1805034/OPG rs 11573871	C/A	18 (5%)	2 (0.52%)		

En el estudio de epistasia hemos introducido el polimorfismo rs104893941 del gen *SQSMT1*, considerada la mutación p. P392L, siendo la variante genética que ha presentado mayor asociación con la EOP descrita en la literatura^{58,157}. Con la introducción de esta variante en el análisis de interacciones pretendimos conocer si podía existir una interrelación entre los tres genes del estudio que pudiera contribuir a un mayor riesgo de desarrollar EOP. A continuación, se describen todas las interacciones entre los polimorfismos estadísticamente significativos analizados en el estudio, con los alelos que se encuentran asociados al riesgo de desarrollar EOP, en función de los modelos codominante y dominante. En general, las distintas asociaciones descritas, incrementan el riesgo a desarrollar EOP, sin embargo el ser portador del alelo T en el polimorfismo RANKrs6567274 mostraba un efecto protector, asociado a una disminución de riesgo de desarrollar EOP. Pero dado que presenta una interacción epistática con alelos de distintos polimorfismos que incrementan el riesgo, el resultado de la suma de ambos se asociaría a un riesgo total aumentado de desarrollar EOP pero con una potencia menor a las observadas en las otras interacciones epistáticas descritas.

Tabla 39. Interacciones entre los polimorfismos estadísticamente significativos en función de los diferentes modelos genéticos codominante y dominante.

Modelo codominante					
Locus 1	SNP1	Locus 2	SNP2	p-valor	Odds ratio (IC95%)
Chr 8 (OPG)	rs11573871 (A)	Chr 18 (RANK)	rs1805034 (C)	0.0022	10.01 (2.29-43.69)
Chr 18 (RANK)	rs1805034 (C)	Chr5 (SQSMT1)	rs104893941 (T)	0.0301	11.84 (1.5-93.26)
Chr5 (SQSMT1)	rs104893941 (T)	Chr 8 (OPG)	rs11573871 (A)	0.00996	8.38 (1.05-66.83)
Chr5 (SQSMT1)	rs104893941 (T)	Chr 18 (RANK)	rs6567274 (T)	0.00022	5.38 (3.50-20.44)
Modelo dominante					
Chr 18 (RANK)	rs6567274 (T)	Chr 18 (RANK)	rs3018362 (A)	0.0315	3.36 (1.60-18.74)

En relación a la epistasia funcional, se analizaron todas las interacciones de los polimorfismos estudiados mediante un modelo genético no paramétrico, MDR (Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial, www.epistasis.org) (sistema MDR-librería “multtest” software R, v 2.15.0), alternativo a la regresión logística para la detección y la caracterización de interacciones entre los polimorfismos no lineales, donde se obtuvieron los siguientes resultados, detallados en la tabla 40. En el análisis de epistasia funcional se observó una mayor significación estadística en la combinación de los polimorfismos rs104893941 (SQSMT1) y rs11573871 (OPG) así como en la combinación de los polimorfismos rs1805034 (RANK) y rs11573871 (OPG) en el riesgo a desarrollar EOP. A pesar que las combinaciones se han identificado en genes diferentes, su efecto podría ser acumulativo en relación al aumento de probabilidad de presentar la EOP.

Tabla 40. Combinaciones con mayor significación en el análisis MDR (multifactor dimensionality reduction, www.epistasis.org)

Combinación	CVC ¹	TBA ²
rs104893941, rs11573871	10/10	0.759
rs1805034, rs11573871	10/10	0.812

¹CVC: “Cross-Validation Consistency”: Coeficiente que indica la identificación de un modelo de reducción multidimensional. Oscila entre 1 y 10, siendo 10 el máximo CVC, que indica que en todas las interacciones llevadas a cabo por el programa ha encontrado la misma combinación. ²TBA: “Testing Balanced Accuracy”: Coeficiente de la combinación de sensibilidad y especificidad del modelo, que indica la exactitud de la predicción.

5.2.2. Estudio molecular del gen *SQSMT1* (*p62*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget. Correlación genotipo-fenotipo.

En el desarrollo de este estudio, se analizaron 200 pacientes afectados de EOP, las características clínico-demográficas se describen en la siguiente tabla 41 en función de la presencia o no de ser portador de las distintas mutaciones del gen *SQSMT1* identificadas en nuestra cohorte.

En nuestra población y en relación a la correlación genotipo-fenotipo, el ser portador de mutaciones en el gen *SQSMT1*, se asocia a una mayor extensión de la enfermedad en función de un mayor número de huesos afectados y mayor porcentaje de casos polioestóticos, y una mayor actividad de la enfermedad, con niveles más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como un mayor porcentaje de pacientes sintomáticos y una mayor edad al diagnóstico, mostrando significación estadística respecto a los pacientes EOP *SQSMT1* negativos. Se ha observado una tendencia en relación a la existencia de una historia familiar positiva en la población portadora de la mutación *SQSMT1* del 13% respecto a la población afectada de EOP sin presencia de la mutación (8%). Sin embargo, no se objetivó diferencias significativas en cuanto al género, al año del diagnóstico y al año del nacimiento, tratamientos realizados o complicaciones acontecidas durante el curso de la enfermedad, entre ambos grupos.

Tabla 41. Características clínico-demográficas de la población afectada EOP, diferencias en cuanto al ser portador de mutaciones en el gen *SQSMT1*.

	EOP <i>SQSMT1</i> positivo (n=54)	EOP <i>SQSMT1</i> negativo (n=146)	p-valor
Género			
Mujer	21 (38.9%)	70 (47.9%)	
Hombre	33(61.1%)	76 (52.1%)	0.163
Año de nacimiento			
Media (Ds)	1933,67 ±10.508	1936,36±10,362	0.105
Mediana(rango)	1932 (48)	1935,00 (41)	
Clínica al diagnóstico (n=149)			
Sintomático	40 (74.1%)	15 (10.3%)	
Asintomático	8 (14.8%)	86 (58.9%)	0.001
Edad del diagnóstico(años)			
Media (Ds)	63.02±11.206	61.56±10.03	
Mediana(rango)	64 (49)	62 (53)	0.049
Año del diagnóstico			
Media (Ds)	1996,69 ±8.704	1997,96±8,129	
Mediana(rango)	1997 (40)	1999,50 (37)	0.336
Historia familiar de EOP positiva	7 (13%)	12 (8.2%)	0.224
Múltiplos de FA al diagnóstico			
Media (Ds)			
Mediana(rango)	3.96±3.010	3.67±3.595	0.039
Distribución gammagráfica:			
Monostótico, n(%)	18 (33,3%)	74 (50.7%)	
Polioestótico, n(%)	36 (66.7%)	72 (49.3%)	0.021
Numero de localizaciones			
Media (Ds)	2.93 ±2.378	2.27 ±2.001	0.045

Tratamiento con BF (n=92)	21 (38.9%)	71 (48.6%)	0.271
Numero de tratamientos realizados Media (Ds)	1.23±1.165	1.41±1.319	0.510
Número de complicaciones Media (Ds)	1.44 ±1.127	1.27±1.183	0.361
Complicaciones asociada a la evolución de la enfermedad:			
-Artropatía por vecindad, n(%)	34 (63%)	78 (53.4%)	0.148
-Sordera/Paget craneal, n(%)	8 (14.8%)	18 (12.3%)	0.400
-Deformidad, n(%)	30 (55.6%)	72 (49.3%)	0.266
-Fractura, n(%)	6 (11.1%)	18 (12.3%)	0.516

A pesar de las diferencias clínico-demográficas evidenciadas entre los portadores de las distintas mutaciones descritas en el estudio respecto a los pacientes no portadores de dichas mutaciones en el SQSMT1, evaluamos si estos hallazgos también se mantendrían en los pacientes portadores de la mutación *SQSMT1 Pro392Leu*, siendo esta la mutación más descrita y asociada a la EOP. Las diferencias entre las distintas poblaciones se describen en la tabla 42.

En relación a la mutación *SQSMT1 Pro392Leu*, identificada en 40 pacientes afectos de EOP, se observó respecto a los pacientes de EOP *Pro392Leu* negativos, una asociación significativa con las variables que reflejan una mayor actividad de la enfermedad y mayor extensión al diagnóstico, como son: mayor número de lesiones óseas y mayor tendencia a la afectación poliostótica, con valores más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como un mayor porcentaje de pacientes sintomáticos y una mayor edad al diagnóstico, mayor número de complicaciones siendo las artropatía por vecindad y la deformidad las más frecuentes, mostrando en todos los casos significación estadística respecto a la población *SQSMT1 Pro392Leu* negativo. En el análisis de asociación entre la presencia de historia familiar positiva y la población portadora de la mutación *SQSMT1 Pro392Leu*, no se objetivó diferencias estadísticamente significativas, pero si una tendencia de mayor porcentaje de antecedentes familiares en los pacientes portadores de la mutación en el gen *SQSMT1 Pro392Leu* del 15% respecto al 8.1% de los pacientes *SQSMT1 Pro392Leu* negativo.

Tabla 42. Características clínico-demográficas de la población afecta EOP, diferencias en cuanto a la presencia de la mutación *SQSMT1 Pro392Leu*.

	Historia familiar positiva n (%)	Múltiplos de FA Media(Ds)	Número de localizaciones Media(Ds)	Distribución gammagrafica Monostótico Poliostótico n (%)	Edad al diagnóstico (años) Media (Ds)
SQSMT1 (Pro392Leu) + (n=40)	6/40 (15%)	4.30±3.14	2.88±1.71	12(30%) 28(70%)	64.38±9.61
SQSMT1 (Pro392Leu) – (n=160)	13/160 (8.1%)	3.61±3.51	2.34±2.21	80(50%) 80(50%)	61.35±10.47
p-valor	0.1915	0.045	0.019	0.017	0.032

	Clínica: Síntomas al diagnóstico n (%)	Artropatía por vecindad n (%)	Deformidad n (%)	Número de complicaciones n (%)
SQSMT1 (Pro392Leu) + (n=40)	30(75%)	29(72.5%)	25(62.5%)	1.53(1.037)
SQSMT1 (Pro392Leu) – (n=160)	25(15.6%)	83(51.9%)	77(48.1%)	1.27(1.17)
p-valor	0.001	0.014	0.003	0.042

En nuestra cohorte de 200 pacientes afectados de EOP, analizamos mediante la secuenciación Sanger automatizada (Applied Biosystems®) del gen *SQSMT1*, todas las regiones codificantes y no codificantes del gen, obteniendo información de los 8 exones, las regiones intrónicas, y las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, donde identificamos 28 mutaciones en total en nuestra cohorte, 17 mutaciones en las regiones exónicas y 11 en las regiones intrónicas. A continuación, analizamos las 17 mutaciones identificadas en las regiones exónicas del gen *SQSMT1*, dado que pueden afectar a la función proteica y por ende en la patogenia de la EOP. En este estudio no analizamos la asociación clínico-molecular de la EOP con las regiones no codificantes, a pesar de su importancia en las funciones de control y regulación génica.

Se han identificado 17 mutaciones en las regiones codificantes del gen (p.R161W, p.H163Y, p.K238E, p.H261H, p.G262R, p.S272S, p.E274D, p.D292D, p.R312R, p.S318S, p.R321C, p.P348P, p.Y383X, p.P392L, p.Q400X, p.M404V, p.G405S), seis de ellas se consideran mutaciones sinónimas, donde existe un cambio de un nucleótido pero no cambia el aminoácido original, dos mutaciones “nonsense”, donde la variante produce un codón de stop prematuro que trunca la proteína y 9 mutaciones “missense”, donde el cambio de un nucleótido genera el cambio de un aminoácido. Tanto las mutaciones “missense” como las que generan un codón de stop prematuro, van a favorecer cambios estructurales y funcionales de la proteína.

La mayor parte de las mutaciones descritas en el gen *SQSMT1/p62* se localizan en el dominio UBA (aminoácidos 386-440) en la región carboxiterminal de la proteína p62, probablemente constituye una región de puntos calientes o “hotspot” con una tasa elevada de recombinación, debido a una inestabilidad inherente en la secuencia del DNA, que favorece una mayor frecuencia de mutaciones.

En nuestro estudio se han identificado 4 mutaciones en el exón 8 que codifica el dominio UBA de la proteína p62: p.P392L, p.Q400X, p.M404V y p.G405S, tres de ellas han sido descritas previamente en la literatura^{58,157,251,261}. La mutación p.G405S es la primera vez que se describe asociada a la EOP y dada la falta de información acerca de esta mutación en las bases de datos genéticas, realizamos un análisis funcional de esta variante “*in silico*” mediante la implementación de herramientas bioinformáticas de predicción como SIFT y Polyphen-2, donde categorizan a esta variante como “seguramente perjudicial” por Polyphen-2 y “deletérea” por SIFT.

La mutación más frecuente identificada en nuestra cohorte ha sido la p.P392L, descrita en el 74% de los pacientes afectados de mutaciones en el gen *SQSMT1* y en el 20% de la población afectada de EOP.

En relación a las mutaciones localizadas externas al dominio UBA, se han descrito seis mutaciones “missense” (p.R161W, p.H163Y, p.K238E, p.G262R, p.E274D, p.R321C) y una mutación “nonsense” como es la mutación p.Y383X. También se han identificado seis mutaciones sinónimas (p.H261H, p.S272S, p.D292D, p.R312R, p.S318S, p.P348P), con un impacto leve en la proteína, dado que el cambio de nucleótido no condiciona un cambio de aminoácido, permaneciendo el original sin comportar disfunción proteica. Sin embargo, las mutaciones “missense” y las “nonsense”, van a ocasionar un impacto moderado y severo en la proteína p62, respectivamente.

En relación al análisis funcional “*in silico*” de las diferentes variantes “missense” y “nonsense” mediante el software de predicción como SIFT, Polyphen-2 y PMut, se han podido categorizar como “seguramente perjudiciales” por Polyphen, “deletéreo” por SIFT y “neutrales” por PMut, excepto las mutaciones p.E274D y p.R321C que las clasifican como mutaciones “neutrales” en función de las 3 herramientas bioinformáticas. Asimismo el software de predicción PMut categoriza como “patógeno” a p.P392L y p.M404V por generar un valor >0.5.

En relación a la localización de las diferentes mutaciones externas al dominio UBA, se describen en la tabla 43. La mutación “nonsense” p.Y383X se localiza cerca del dominio UBA. Las mutaciones p.E274D y p.R321C están localizadas en la parte del exón 6 del gen *SQSMT1*, que codifica el dominio PEST1 y en el dominio LIR de la proteína p62, respectivamente. La mutación p.G262R está localizada también en el

exón 6 del gen *SQSMT1* y se localiza cerca del dominio PEST1 en la proteína p62. En el exón 5 del gen *SQSMT1* se encuentra la mutación p.K238E, que codifica el dominio TBS (TRAF6 binding sequence) de la proteína p62. Asimismo, las mutaciones p.R161W y p H163Y se encuentran localizadas en la parte del exón 3 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio ZZ de la proteína P62, en ambos casos.

Tabla 43. Características de las diferentes mutaciones identificadas en las regiones codificantes del gen SQSMT1 en nuestra población de pacientes.

Gen Cromosoma	Localización	Cambio cDNA	Alelo riesgo	Cambio proteína	dbSNP	Región	Codón	Dominio afectado P62	Tipo de mutación	Polyphen-2 (0-1)	SIFT (0-1)	PMut	Impacto
SQSMT1 (Crh5)	5:179824037-179824037	c.659 C>T	T	R161W* p.Arg161T	rs758625124	Exón3	CGG/TGG	Dominio ZZ	"Missense"	0.67 Seguro perjudicial	0.00 Deletérea	0.25 (91%) Neutral	Moderado
	5:179824043-179824043	c.665 C>T	T	H163Y* p.His163Tyr	rs1216959569	Exón3	CAC/TAC	Dominio ZZ	"Missense"	0.995 Seguro perjudicial	0.00 Deletérea		Moderado
	5:179825184-179825184	c.890 A>G	G	K238E* p.Lys238Glu	rs11548633	Exón5	AAG/GAG	TBS (TRAF6)	"Missense"	0.717 Seguro perjudicial	0.02 Deletérea	0.44 (85%) Neutral	Moderado
	5:179833060-179833060	c.961 C>T	T	H261H p.His261His	rs145001811	Exón6	CAC/CAT	Close to PEST1	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833061-179833061	c.962 G>A	A	G262R* p.Gly262Arg	rs763179729	Exón6	GGA/AGA	Close to PEST1	"Missense"	0.726 Seguro perjudicial	0.06 Deletérea	0.39 (86%) Neutral	Moderado
	5:179833093-179833093	c.994 G>A	A	S272S p.Ser272Ser		Exón6	TCG/TCA	PEST1	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833099-179833099	c.1000 G>C	C	E274D* p.Glu274Asp	rs55793208	Exón6	GAG/GAC	PEST1	"Missense"	0.004 Benigna	0.38 Benigna	0.05 (97%) Neutral	Moderado
	5:179833153-179833153	c.1054 C>T	T	D292D p. Asp292Asp	rs4935	Exón6	GAC/ GAT	PEST1	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833213-179833213	c.1114 G>A	A	R312R p. Arg312Arg	rs4797	Exón6	AGG/AGA	Close to LIR	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833231-179833231	c.1132 C>T	T	S318S p.Ser318Ser	rs56092424	Exón6	TCC/TCT	Close to LIR	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833238-179833238	c.1139 C>T	T	R321C* p.Arg321Cys	rs140226523	Exón6	CGC/TGC	Close to LIR	"Missense"	0.224 Benigna	0.05 Deletérea	0.10 (96%) Neutral	Moderado
	5:179833661-179833661	c.1222 G>A	A	P348P p.Pro348Pro	rs10058037	Exón7	CCG/CCA	KIR	Sinónima	-	-	-	Leve
	5:179833766-179833766	c.1327 C>A	A	Y383X p.Tyr383*	rs1561606273	Exón7	TAC/ TAA	Close to UBA	"Nonsense"	-	-	-	Alto
	5:179836445-179836445	c.1353 C>T	T	P392L p.Pro392Leu	rs104893941	Exón8	CCG/CTG	UBA	"Missense"	0.969 Seguro perjudicial	0.00 Deletérea	0.60 (83%) Patógena	Moderado
5:179836468-179836468	c.1376 C>T	T	Q400X p.Gln400*	rs1260660969	Exón8	CAG/TAG	UBA	"Nonsense"	-	-	-	Alto	

Resultados

5:179836480-179836480	c.1388 A>G	G	M404V p.Met404Val	rs771966860	Exón8	ATG/GTG	UBA	"Missense"	0.847 Seguro perjudicial	0.00 Deletérea	0.71 (86%) Patógena	Moderado
5:179836483-179836483	c.1391 G>A	A	G405S* p.Gly405S	-	Exón8	GGC/AGC	UBA	"Missense"	0.847 Seguro perjudicial	0.00 Deletérea	-	Moderado

*Se detallan las nuevas variantes genéticas, no descritas previamente en la literatura científica asociadas a la EOP, en color rojo.

Tabla 44. Características clínicas de los 54 pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSMT1*.

Mutación	Paciente	Sexo (Ho/Mu)	Edad al diagnóstico	Año de nacimiento	Número de localizaciones	Múltiplos de FA	Historia familiar	Clínica al diagnóstico	Sordera/Paget craneal	Artropatía por vecindad	Deformidad	Fractura
p. R161W	Paciente 1	H	70	1935	2	1,61	No	Si	No	No	No	No
p.H163Y+ p.P392L	Paciente 2	H	54	1943	1	1,55	No	No	No	No	No	No
p.K238E	Paciente 3	H	37	1948	3	1,51	No	Si	No	No	No	No
p.K238E + p.E274D	Paciente 4	H	66	1926	3	1,78	No	Si	Si	No	No	No
p.G262R	Paciente 5	H	40	1940	1	0,83	No	No	No	No	No	No
p.E274D	Paciente 6	H	67	1941	1	1,78	No	No	Si	No	No	No
	Paciente 7	H	52	1948	1	4,65	No	No	Si	No	No	No
	Paciente 8	H	59	1931	1	1,62	Si	No	No	Si	Si	No
p.E274D+ p.P392L	Paciente 9	H	52	1936	5	6,74	Si	No	No	Si	Si	Si
p. R321C + p.P392L	Paciente 10	H	58	1931	4	2,86	No	Si	No	Si	Si	No
p.Y383*	Paciente 11	M	36	1949	14	9,88	No	Si	Si	Si	Si	No
p. Q400*	Paciente 12	H	46	1924	9	6,12	No	Si	Si	Si	Si	Si
p. M404V	Paciente 13	M	76	1917	2	1,72	No	Si	No	No	No	Si
	Paciente 14	M	68	1920	1	2,79	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 15	M	60	1939	2	1,27	No	Si	No	Si	Si	Si
	Paciente 16	M	79	1929	2	2,48	No	Si	No	No	No	No

Resultados

p.G405S	Paciente 17	H	72	1931	1	3,97	No	Si	No	No	No	No
p.P392L	Paciente 18	H	47	1951	3	7,78	No	Si	No	No	No	No
	Paciente 19	M	45	1962	1	2,17	No	Si	No	No	No	No
	Paciente 20	H	76	1920	4	7,05	No	Si	No	Si	Si	Si
	Paciente 21	H	76	1926	2	0,54	No	Si	No	No	No	No
	Paciente 22	H	72	1922	5	6,27	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 23	M	85	1914	1	3,06	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 24	M	71	1925	3	5,36	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 25	H	75	1919	3	2,35	No	Si	Si	No	No	No
	Paciente 26	H	59	1932	1	4,21	No	Si	No	No	No	No
	Paciente 27	M	69	1924	2	0,38	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 28	M	65	1926	1	1,7	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 29	M	71	1921	4	2,55	No	Si	Si	Si	Si	No
	Paciente 30	M	72	1929	2	2	No	Si	No	No	No	No
	Paciente 31	M	76	1931	3	1,34	No	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 32	H	55	1938	1	3,75	Si	Si	No	Si	Si	No
	Paciente 33	H	64	1930	1	2,89	No	Si	No	Si	No	No
	Paciente 34	M	59	1935	6	14,48	No	Si	No	Si	No	No
	Paciente 35	H	48	1954	2	1,53	No	Si	No	No	No	No
Paciente 36	H	62	1941	2	0,54	No	Si	No	Si	Si	No	
Paciente 37	H	60	1944	2	5,17	No	Si	No	Si	Si	No	
Paciente 38	M	73	1931	1	2,16	No	Si	No	Si	Si	Si	

Resultados

Paciente 39	M	64	1943	1	1,41	No	Si	No	Si	Si	No
Paciente 40	M	63	1933	4	2,88	No	Si	No	Si	Si	No
Paciente 41	H	70	1923	2	4,88	No	No	Si	Si	Si	No
Paciente 42	H	73	1927	4	3,01	No	No	No	Si	No	No
Paciente 43	H	67	1935	7	9,92	Si	No	Si	Si	Si	No
Paciente 44	H	52	1928	4	4,24	No	No	No	No	No	No
Paciente 45	M	68	1942	3	3,37	No	No	No	No	No	No
Paciente 46	H	73	1932	3	6,89	Si	No	No	Si	Si	No
Paciente 47	M	74	1934	1	5,03	Si	No	No	Si	Si	No
Paciente 48	H	61	1919	5	6,04	No	No	No	Si	No	No
Paciente 49	H	56	1932	5	6,12	No	No	No	Si	Si	No
Paciente 50	H	50	1948	6	13,17	No	No	No	Si	Si	No
Paciente 51	H	62	1936	5	6,74	Si	No	No	Si	Si	No
Paciente 52	M	77	1928	1	3,48	No	No	No	Si	Si	No
Paciente 53	M	63	1945	1	2,71	No	No	No	Si	Si	No
Paciente 54	H	58	1950	3	3,48	No	No	No	No	No	No

En relación a la correlación genotipo-fenotipo, 54 (27%) pacientes presentaban alguna mutación en el gen del *SQSMT1*, en la tabla 44, se describen las características clínicas de cada paciente. Todos los pacientes eran portadores de las distintas mutaciones en heterocigosis. El 7.5% de los pacientes eran portadores de dos mutaciones en el gen del *SQSMT1*, las asociaciones descritas fueron las siguientes: p.H163Y + p.P392L, p.K238E + p.E274D, p.E274D + p.P392L, p. R321C + p.P392L, no mostrando mayor severidad en el fenotipo respecto a los pacientes portadores de una única mutación.

Tabla 45. Características clínico-demográficas de los pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSM1* en función de la presencia de mutaciones “missense” y mutaciones “nonsense”.

Tipo de mutación	Mutación	Sujetos afectados (n)	Sexo	Año de nacimiento	Edad al diagnóstico	Numero de localizaciones	Múltiplos de FA	Historia familiar positiva	Clínica al diagnóstico
Mutaciones “missense”	R161W* Arg161Trp	1	H	1935	70	2	1.61	No	Si
	H163Y* His163Tyr	1	H	1943	54	1	1.55	No	No
	K238E* Lys238Glu	2	H	1937±15.55	51.50±20.51	3	1.65±0.19	No	Si
	G262R* Gly262Arg	1	H	1940	40	1	0.83	No	No
	E274D* Glu274Asp	5	H	1936.40±8.56	59.20±7.26	2.20±1.79	3.31±2.30	2 (40%)	2(40%)
	R321C* Arg321Cys	1	H	1931	58	4	2.86	No	Si
	P392L Pro392Leu	40	Ho:24 (60%) Mu:6 (40%)	1933.50±10.65	64.38±9.62	2.88±1.71	4.30±3.15	6 (15%)	30 (75%)
	M404V Met404Val	4	M	1926.25±9.91	70.75±8.54	1.75±0.50	2.07±0.69	No	3 (75%)
	G405S* Gly405Ser	1	H	1931	72	1	3.97	No	Si
Mutaciones “nonsense”	Y383X Tyr383*	1	M	1949	36	14	9.88	No	Si
	Q400X Gln400*	1	H	1924	39	9	6.12	No	Si

*Se detallan las nuevas variantes genéticas, no descritas previamente en la literatura científica asociadas a la EOP, en color rojo.

Las características clínico-demográficas de los pacientes portadores de las distintas mutaciones en el gen *SQSM1* (tabla 45), de acuerdo con el tipo de mutación “*missense*” o “*nonsense*” asociada, se ha observado un fenotipo más grave en función de la extensión y actividad de la enfermedad con mayor número de localizaciones óseas y niveles más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como la presencia de sintomatología y una edad más temprana en el momento del diagnóstico, asociado a los pacientes portadores de las mutaciones “*nonsense*” respecto a los pacientes portadores de mutaciones “*missense*”. Por consiguiente, el fenotipo tiende a ser más grave en pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1* que ocasiona una proteína truncada que aquellas mutaciones “*missense*”, dado que producen una disfunción más importante en la proteína p62.

5.2.2.1. Identificación y caracterización de las nuevas variantes genéticas en el gen *SQSM1* en pacientes con enfermedad ósea de Paget.

En el estudio identificamos siete mutaciones “*missense*”: p.R161W (Arg161Trp), p.H163Y (His163Tyr), p.K238E (Lys238Glu), p.G262R (Gly262Arg), p.E274D (Glu274Asp), R321C (Arg321Cys) y p.G405S (Gly405Ser), no descritas previamente en la literatura, asociadas a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de la EOP.

5.2.2.1.1. Mutación p.R161W (Arg161Trp)

La variante genética “*missense*” p.R161W (Arg161Trp) se describe en heterocigosis en un paciente varón sin presencia de antecedentes familiares y con clínica al diagnóstico. El resto de características clínico-demográficas se describen en la tabla 44 y 45.

Esta variante es consecuencia de la mutación c.659C>T, localizada en el exón 3 del gen *SQSM1* que codifica el dominio ZZ de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la arginina por triptófano en el codón 161 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción como SIFT , Polyphen-2, pMUT, categorizando a la variable como "Deletérea" por SIFT; "Posiblemente perjudicial" por PolyPhen-2; “ neutral” por pMUT .

En relación al estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **R** está conservado parcialmente en las diferentes especies.

<i>Homo sapiens</i> (Human)	CPDYDLCSVCEGKGLH R GHTKLAFPS
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	CPDYDLCSVCEGKGLH R EHSKLIFPN
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	CPDYDLCSVCEGKGLH R EHSKLIFPN
<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzee)	CPDYDLCSVCEGKGLH R GHTKLAFPS
<i>Felis catus</i> (Cat)	CPDYDLCAACEGKGLH R EHNKLVFPT
<i>Equus caballus</i> (Horse)	CPDYDLCASCEGKGMH R EHSKLAFPS
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	CPDYDLCAACEGKGIH K EHSKLAFPS
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (Giant panda)	CPDYDLCAACEGKGLH R EHSKLVFPA
<i>Myotis lucifugus</i> (Little brown bat)	CPDYDLCAGCEGKGMH R EHSKLAFPS
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	CPDYDLCGACEAKGLH Q EHSKLAFPS
<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	CPDYDLCSTCEGKGIH K EHNMVMFQS
<i>Loxodonta africana</i> (African elephant)	CPDYDLCAACEGKGLH G EHSKLAFPT
<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)	CPDYDLCSVCEGKGLH R EHSKLIFPN
<i>Sarcophilus harrisii</i> (Tasmanian devil)	CPDYDLCSSCESKGLH K EHNMVIFQN
<i>Ovis aries</i> (Sheep)	CPDYDLCASCEGKGLH R EHGKLAFFS
<i>Gopherus agassizii</i> (Agassiz's desert tortoise)	CPDYDLCSTCEGKGIH K EHNMIMFQS
<i>Bos taurus</i> (Bovine)	CPDYDLCASCEGKGLH R EHGKLAFFS
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	CPDYDLCPTCQSKGLH K EHALLPIFH

Figura 27. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.R161W

Esta variante no ha sido descrita en la literatura científica previamente asociada a la EOP ni en otra patología vinculada al gen *SQSMT1*. Por consiguiente, la evidencia disponible actualmente es insuficiente para determinar el papel de esta variante en la enfermedad. Por lo tanto, se ha clasificado como una variante de significado incierto.

5.2.2.1.2. Mutación p.H163Y (p.His163Tyr)

La variante genética “*missense*” p.H163Y (His163Tyr) se describe en heterocigosis asociado a la mutación p.P392L en un paciente varón de carácter esporádico y asintomático al diagnóstico. El resto de características clínico-demográficas se describen en la tabla 44 y 45.

Esta variante es consecuencia de la mutación c.665 C>T, localizada en el exón 3 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio ZZ de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la histidina por tirosina en el codón 163 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción como SIFT, Polyphen-2, categorizando a la variable genética como "Deletérea" por SIFT; " Seguramente perjudicial" por PolyPhen-2

En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **H** está conservado evolutivamente.

<i>Homo sapiens (Human)</i>	CPDYDLCVCEGKGLHRG H TKLAFPS
<i>Mus musculus (Mouse)</i>	CPDYDLCVCEGKGLHRE H SKLIFPN
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	CPDYDLCVCEGKGLHRE H SKLIFPN
<i>Pan troglodytes (Chimpanzee)</i>	CPDYDLCVCEGKGLHRG H TKLAFPS
<i>Felis catus (Cat)</i>	CPDYDLCAACEGKGLHRE H NKLVFPT
<i>Equus caballus (Horse)</i>	CPDYDLCASCEGKGMHRE H SKLAFPS
<i>Sus scrofa (Pig)</i>	CPDYDLCAACEGKGIHKE H SKLAFPS
<i>Ailuropoda melanoleuca (Giant panda)</i>	CPDYDLCAACEGKGLHRE H SKLVFPA
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	CPDYDLCAGCEGKGMHRE H SKLAFPS
<i>Oryctolagus cuniculus (Rabbit)</i>	CPDYDLCGACEAKGLHQE H SKLAFPS
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	CPDYDLCSTCEGKGIHKE H NMVMFQS
<i>Loxodonta africana (African elephant)</i>	CPDYDLCAACEGKGLHGE H SKLAFPT
<i>Mesocricetus auratus (Golden hamster)</i>	CPDYDLCVCEGKGLHRE H SKLIFPN
<i>Sarcophilus harrisii (Tasmanian devil)</i>	CPDYDLCSSCESKGLHKE H NMVIQON
<i>Ovis aries (Sheep)</i>	CPDYDLCACEGKGLHRE H GKLAFFPS
<i>Gopherus agassizii (Agassiz's desert tortoise)</i>	CPDYDLCSTCEGKGIHKE H NMIMFQS
<i>Bos taurus (Bovine)</i>	CPDYDLCACEGKGLHRE H GKLAFFPS
<i>Danio rerio (Zebrafish (Brachydanio rerio))</i>	CPDYDLCPTCQSKGLHKE H ALLPIFH

Figura 28. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.H163Y

La mutación p.H163Y no ha sido descrita en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectos de EOP ni a otra entidad relacionada con el gen *SQSTM1*. Tampoco podemos valorar el impacto de esta mutación de forma aislada en el fenotipo del paciente, dado que en nuestra población esta variante se ha identificado en un único paciente portador de la mutación p.P392L de forma simultánea, dificultando así el análisis del efecto de la variante p.H163Y en la EOP. Por consiguiente, la evidencia científica disponible actualmente es insuficiente para determinar el impacto de esta variante en la enfermedad.

5.2.2.1.3 Mutación p.K238E (p.Lys238Glu)

La variante genética “*missense*” p.K238E (p.Lys238Glu) se describe en heterocigosis en dos pacientes varones en nuestra cohorte, uno de ellos portador de la mutación p.E274D asociada y en el otro paciente únicamente se describe la variante p.K238E en el gen del *SQSMT1*. En la siguiente tabla se detallan las características clínicas de los dos pacientes portadores de la variante p.K238E respecto a la población EOP *SQSMT1* negativo, donde se observa una mayor extensión de la enfermedad en función de un mayor número de localizaciones al diagnóstico respecto a la población *SQSMT1* negativo, mostrando significación estadística. En el resto de variables evaluadas no se han descrito diferencias significativas entre ambos grupos, probablemente el tamaño muestral es una limitación de dicho análisis.

Tabla 46. Características clínicas de los pacientes afectados de EOP portadores de la mutación p.K238E (p.Lys238Glu) respecto a la población de pacientes *SQSMT1* negativo.

	SQSMT1 K238E (n=2)	SQSMT1 negativo (n=146)	p-valor
Edad al diagnóstico media, Ds	51.50±20.51	61.56±10.03	0.378
Número de localizaciones media, Ds	3	2.27±2.01	0.050
Múltiplos de FA Media, Ds	1.65±0.19	3.67±3.60	0.595
Historia familiar (%)	No	12 (8.2%)	-
Número de complicaciones media, Ds	0.50±0.70	1.44±1.127	0.361
Año de nacimiento Media, Ds	1937±15.55	1936.36±10.36	0.105
Género, n (%)	Ho:2,(100%)	Mu:70,(47.9%) Ho:76, (52.1%)	-

La variante genética “*missense*” p.K238E (p.Lys238Glu) es consecuencia de la mutación c.890 A>G, localizada en el exón 5 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio TBS (TRAF6 binding sequence) de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la lisina por ácido glutámico en el codón 238 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción como SIFT, Polyphen-2, pMUT, categorizando a la variable como "Deletérea" por SIFT; " Posiblemente perjudicial" por PolyPhen-2; "neutral" por pMUT.

En cuanto al estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **K** está conservado evolutivamente.

<i>Homo sapiens</i> (Human)	SASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	SASAPPEDPNVNFL K NVGESVAA
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	SASAPSEDPNVNFL K NVGESVAA
<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzee)	SASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Felis catus</i> (Cat)	SASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Equus caballus</i> (Horse)	SASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (Giant panda)	SAAGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Myotis lucifugus</i> (Little brown bat)	KASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	SASGPSEDPNVNFL K NVGESVAA
<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	STNSQPQDPNVTFL K NVGESVAA
<i>Loxodonta africana</i> (African elephant)	KASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)	SASGPSEDPSVNFL K SVGESVAA
<i>Sarcophilus harrisi</i> (Tasmanian devil)	ASTNSQQDPNVTFL H NVGESVAA
<i>Ovis aries</i> (Sheep)	KASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Gopherus agassizii</i> (Agassiz's desert tortoise)	AFNSQPQ-DHVTFL K NVGESVAA
<i>Bos taurus</i> (Bovine)	SASGPSEDPSVNFL K NVGESVAA
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish) (<i>Brachydanio rerio</i>)	NGATASSQANVEYL K NIIGEEVAA

Figura 29. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.K238E

La variante genética p.K238E (p.Lys238Glu) no ha sido identificada en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectados de EOP, sin embargo se ha descrito en pacientes afectados de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal^{268,269,270}. En los pacientes EOP portadores de la variante genética p.K238E, se descartó patología neurodegenerativa asociada al diagnóstico y durante el periodo del estudio.

5.2.2.1.4. Mutación p.G262R (Gly262Arg)

La variante genética “*missense*” p.G262R (Gly262Arg) se describe en heterocigosis en un paciente varón sin presencia de antecedentes familiares y asintomático al diagnóstico. El resto de características clínico-demográficas se describen en las tablas 44 y 45.

Esta variante es consecuencia de la mutación c.962 G>A, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio PEST1 de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la arginina por triptófano en el codón 262 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de

predicción como SIFT , Polyphen-2, pMUT, categorizando a la variante como "Deletérea" por SIFT; " Posiblemente perjudicial" por PolyPhen-2; "neutral" por pMUT En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **G** está conservado evolutivamente.

<i>Homo sapiens (Human)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPSS
<i>Mus musculus (Mouse)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPTTPESS
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPSAESS
<i>Pan troglodytes (Chimpanzee)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPSS
<i>Felis catus (Cat)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPGSS
<i>Equus caballus (Horse)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTSVSPGSS
<i>Sus scrofa (Pig)</i>	-SGIEVDIDVEHGGKRSRLTPTSPGSS
<i>Ailuropoda melanoleuca (Giant panda)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPGSS
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPGSS
<i>Oryctolagus cuniculus (Rabbit)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPASPSS
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	PLGIEVDIDVEHGGQRSKVTTPASPNS
<i>Loxodonta africana (African elephant)</i>	PLGPCQVLKNEHGMMAEKGLVSLLSRS
<i>Mesocricetus auratus (Golden hamster)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPTSPSS
<i>Sarcophilus harrisi (Tasmanian devil)</i>	PLGIDVDIDVEHGGKRTKVTTPSCSQSS
<i>Ovis aries (Sheep)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPSSAGSS
<i>Gopherus agassizii (Agassiz's desert tortoise)</i>	PLGIEVDIDVEHGGQKSKVTTPCSSSQ
<i>Bos taurus (Bovine)</i>	PLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPTSPGSS
<i>Danio rerio (Zebrafish (Brachydanio rerio))</i>	PLGIDVDIDVEHGGKRTKVTTPFPASS

Figura 30. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.G262R

La variante genética p.G262R (Gly262Arg) no ha sido identificada en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectos de EOP, sin embargo se ha descrito en pacientes afectos de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica¹⁵⁹. En el paciente afecto de EOP portador de la variante p.G262R, se descartó patología neurodegenerativa asociada al diagnóstico y durante el periodo del estudio.

A pesar de la insuficiente evidencia científica disponible acerca de esta variante en la actualidad, pero dado la información aportada tanto del impacto de esta mutación en otra patología como es la esclerosis lateral amiotrófica y las evidencias procedentes de las herramientas bioinformáticas de predicción así como por su localización en el dominio PEST1 de la proteína p62, esta mutación podría tener una repercusión en la fisiopatología de la EOP.

5.2.2.1.5. Mutación p.E274D (Glu274Asp)

La variante genética “missense” p.E274D (Glu274Asp) se describe en heterocigosis en cinco pacientes varones con presencia de antecedentes familiares y clínica al diagnóstico en el 40% de los pacientes portadores de esta variante. Dos pacientes eran portadores de dos mutaciones en el gen *SQSMT1* cada uno, como son p.E274D + p.P392L, p.K238E + p.E274D, y el resto de pacientes solo era portador de la mutación p.E274D, sin mostrar diferencias significativas entre ellos, en relación a las características clínico-demográficas.

En la siguiente tabla se detallan las características clínicas de los cinco pacientes portadores de la variante p.E274D respecto a la población EOP *SQSMT1* negativo, donde se observa una mayor extensión de la enfermedad en función de un mayor número de localizaciones al diagnóstico respecto a la población *SQSMT1* negativo, así como la presencia de una historia familiar positiva, mostrando significación estadística en ambas variables. En el resto de variables evaluadas no se han descrito diferencias significativas entre ambos grupos, probablemente el tamaño muestral es una limitación de dicho análisis.

Tabla 47. Características clínicas de los pacientes afectados de EOP portadores de la mutación p.E274D (Glu274Asp) respecto a la población de pacientes *SQSMT1* negativo.

	SQSMT1 E274D (n=5)	SQSMT1 negativo (n=146)	p-valor
Edad al diagnóstico media, Ds	59.20±7.26	61.56±10.03	0.378
Número de localizaciones media, Ds	2.20±1.79	2.27±2.01	0.049
Múltiplos de FAT Media, Ds	3.31±2.30	3.67±3.60	0.595
Historia familiar (%)	2 (40%)	12 (8.2%)	0.016
Número de complicaciones media, Ds	1.40±1.40	1.44±1.127	0.361
Año de nacimiento Media, Ds	1936.40±8.56	1936.36±10.36	0.105
Género, n (%)	Ho:2,(100%)	Mu:70,(47.9%) Ho:76, (52.1%)	-

Esta variante es consecuencia de la mutación c.1000 G>C, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio PEST1 de la proteína p62. Esta mutación se

caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza el ácido glutámico por ácido aspártico en el codón 274 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción (SIFT, Polyphen-2, pMUT) categorizando como “neutral” a la variante mediante las 3 herramientas bioinformáticas.

En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **E** está semiconservado evolutivamente.

<i>Homo sapiens (Human)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSP ESS
<i>Mus musculus (Mouse)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPTT PESS
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPTS AESS
<i>Pan troglodytes (Chimpanzee)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSP PESS
<i>Felis catus (Cat)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSP PGSS
<i>Equus caballus (Horse)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTSVSP PGSS
<i>Sus scrofa (Pig)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPTSP PGSS
<i>Ailuropoda melanoleuca (Giant panda)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSP PGSS
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSP PGSS
<i>Oryctolagus cuniculus (Rabbit)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPAS PESS
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	GIEVDIDVEHGGQRSKVT PASNQE
<i>Loxodonta africana (African elephant)</i>	GPCQVLKNEGMAEKGLVSLLS SRAS
<i>Mesocricetus auratus (Golden hamster)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPTS PESS
<i>Sarcophilus harrisi (Tasmanian devil)</i>	GIDVDIDVEHGGKRTKVTPSCS QSY
<i>Ovis aries (Sheep)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPSS AGSS
<i>Gopherus agassizii (Agassiz's desert tortoise)</i>	GIEVDIDVEHGGQKSKVT PPCS SSQ
<i>Bos taurus (Bovine)</i>	GIEVDIDVEHGGKRSRLTPTS AGSS
<i>Danio rerio (Zebrafish)(Brachydanio rerio)</i>	GIDVDIDVEHEGKRTKVTP TPPASS

Figura 31. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.E274D

La mutación p.E274D (Glu274Asp) no ha sido identificada en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectos de EOP, sin embargo se ha descrito en pacientes afectos de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal^{269,270,293}. Durante el estudio, se descartó patología neurodegenerativa asociada en los pacientes portadores de la variante p.E274D al diagnóstico y durante el periodo del estudio.

5.2.2.1.6. Mutación R321C (Arg321Cys)

La variante “missense” R321C (Arg321Cys) se describe en heterocigosis asociado a la mutación p.P392L en un paciente varón sin presencia de antecedentes familiares y con

clínica al diagnóstico. El resto de características clínico-demográficas se describen en las tablas 44 y 45.

Esta variante es consecuencia de la mutación c.961C>T, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio LIR de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la arginina por cisteína en el codón 321 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción (SIFT, Polyphen-2, pMUT), pudiendo categorizar a la variable como "Deletérea" por SIFT; "Seguramente perjudicial" por PolyPhen-2; "neutral" por pMUT

En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **R** no está conservado evolutivamente, siendo el aminoácido **Q** el presente en la gran mayoría de las especies detalladas, no se observa en ninguna especie la presencia del aminoácido **C**.

<i>Homo sapiens (Human)</i>	VEGATQSLAEQMRKIALESE-G----- RP
<i>Mus musculus (Mouse)</i>	GEGPAQSLTEQMKKIALESV-G----- QP
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	GEGPAQSLTEQMKKIALESV-G----- QP
<i>Pan troglodytes (Chimpanzee)</i>	VEGATQSLAEQMRKIALESE-G----- RP
<i>Felis catus (Cat)</i>	TEGAARSLAEQMDKIALEPG----- QP
<i>Equus caballus (Horse)</i>	MEGTAQSLAEQMNKIALESV-G----- QP
<i>Sus scrofa (Pig)</i>	VEGTAQCLVEQMNKIALESV-G----- QP
<i>Ailuropoda melanoleuca (Giant panda)</i>	PEGTAQSLAEQMNKIALESV-G----- PP
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	MEGAAQALAKQMNKITLQSG-V----- QP
<i>Oryctolagus cuniculus (Rabbit)</i>	SEGTAQSLAEQMKKIALETG-A----- QP
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	-ATVVNTVAEQIQDMVIDPVPTQMEDGSL QS
<i>Loxodonta africana (African elephant)</i>	FRSAQRSC-GVRXHVLMCSH-E----- FI
<i>Mesocricetus auratus (Golden hamster)</i>	GEGTSQSLTEQMKKIALESV-G----- QP
<i>Sarcophilus harrisii (Tasmanian devil)</i>	SEMEMASLSEQMVKVVKCS-MQVDERPS ST
<i>Ovis aries (Sheep)</i>	VEGTTQSLTEQMNKIALESV-G----- QP
<i>Gopherus agassizii (Agassiz's desert tortoise)</i>	VPEREGSITEQMVMVIDPPSTDMDSN FL
<i>Bos taurus (Bovine)</i>	VEGTAQSLTEQMNKIALESV-G----- QH
<i>Danio rerio (Zebrafish (Brachydanio rerio))</i>	--ATEE----- SV

Figura 32. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.R321C.

5.2.2.1.7. Mutación p.G405S (Gly405Ser)

La variante "missense" p.G405S (Gly405Ser) se describe en heterocigosis en un paciente varón sin presencia de antecedentes familiares y con clínica al diagnóstico. El resto de características clínico-demográficas se describen en las tablas 44 y 45.

Esta variante es consecuencia de la mutación c.1213G>A, localizada en el exón 8 del gen SQSMT1 que codifica el dominio UBA de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la glicina por serina en el codón 405 de la proteína p62.

Los algoritmos desarrollados para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se analiza mediante los distintos softwares de predicción como SIFT, Polyphen-2, categorizando a la variable como "Deletérea" por SIFT y "Seguramente perjudicial" por PolyPhen-2.

En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido **G** está conservado evolutivamente.

<i>Homo sapiens (Human)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Mus musculus (Mouse)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Pan troglodytes (Chimpanzee)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGRLTRL
<i>Felis catus (Cat)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Equus caballus (Horse)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Sus scrofa (Pig)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Ailuropoda melanoleuca (Giant panda)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Oryctolagus cuniculus (Rabbit)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Loxodonta africana (African elephant)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Mesocricetus auratus (Golden hamster)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Sarcophilus harrisii (Tasmanian devil)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Ovis aries (Sheep)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGWLTRL
<i>Gopherus agassizii (Agassiz's desert tortoise)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDDGGWLTRL
<i>Bos taurus (Bovine)</i>	LPPEADPRLIESLSQMLSM G FSDEGGSSSEA
<i>Danio rerio (Zebrafish (Brachydanio rerio))</i>	LPQDADPRLIVESLSQMLSM G FTDEGGWLTRL

Figura 33. Estudio de la conservación aminoacídica inter-especie para la mutación p.G405S.

La variante genética p.G405S no ha sido identificada en la literatura previamente asociada a pacientes afectos de EOP ni a otra entidad relacionada con el gen del *SQSTM1*. Por consiguiente, la evidencia científica disponible actualmente es insuficiente para determinar el impacto de esta variante en la enfermedad, dado que únicamente disponemos de la información aportada por las herramientas bioinformáticas de predicción, y la localización de la variante en el dominio UBA, ambas informaciones podrían sugerir una posible repercusión de esta variable en la patogenia de la EOP. Pero serían necesarios estudios funcionales y estudios en modelos animales para evidenciar el efecto deletéreo de esta variante en la EOP.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Estudio clínico y epidemiológico de la EOP en nuestra área de baja prevalencia

La enfermedad ósea de Paget, es considerada la segunda enfermedad más frecuente que afecta al metabolismo óseo, tras la osteoporosis y se caracteriza por ser un trastorno crónico y focal del remodelado óseo con una resorción incrementada, acompañada de un aumento en la actividad osteoblástica que conlleva a un tejido óseo de estructura anárquica y propiedades biomecánicas alteradas con una resistencia disminuida siendo más susceptible a deformidades y fracturas.

Cabe destacar la importancia de los estudios que evalúan los cambios seculares de la EOP, dado que éstos permiten establecer hipótesis sobre la etiología, patogenia y severidad de la misma, así como proporcionar datos sobre el impacto socio-sanitario que ocasiona esta enfermedad.

La estimación de la prevalencia de la EOP es realmente controvertida, depende de los grupos étnicos, de los países analizados, incluso de las distintas áreas geográficas de donde proceden. Es un hecho incuestionable que la frecuencia de esta entidad aumenta con la edad en ambos sexos, sin embargo es difícil precisar su frecuencia en la población general debido al elevado número de formas asintomáticas.

Conocemos que existen variaciones geográficas importantes, se ha observado una alta prevalencia en Reino Unido^{14,15} del 5.4% en mayores de 55 años, llegando al 7% en mayores de 85 años, en Australia²⁴, en Nueva Zelanda¹⁶ y en EEUU¹¹ (el 1-3% en los mayores de 65 años, alcanzando el 10% en los mayores de 80 años). Por el contrario, presenta una prevalencia minoritaria (menos del 1%) en Japón¹¹, sudeste asiático, África¹⁷ y en los países escandinavos (0,4%), y con una prevalencia intermedia se situarían diferentes países europeos como Alemania (1,3%)¹⁹, Holanda (3,6 %) ²⁰, Francia (2,4%)²⁰, España (1,21%)^{22,23} e Italia (0,3%)²¹.

Los últimos datos de prevalencia que conocemos a nivel nacional, en España, provienen de un estudio de prevalencia multicéntrico, en base a la revisión de radiografías de abdomen en personas mayores de 55 años durante el periodo comprendido 2006-2007, donde participaron 13 centros, distribuidos en 18 áreas geográficas, donde se analizaron 4528 radiografías, identificándose 44 casos de EOP entre los individuos mayores de 55 años, lo que representa una prevalencia de un 1.0%

[IC95%: 0,9-1,3], siendo la prevalencia en Cataluña del 0,47% [IC95%: 0,01-0,93] en el estudio²³. Este dato de prevalencia fue inferior al habitualmente utilizado para España, del ~1,3% de la población mayor de 55 años²², que se estimó en la década de los 70, en el estudio de Detheridge²⁰, basado en una encuesta por correo a radiólogos de varios países europeos, con las limitaciones que esta metodología puede comportar²⁰. Nuestro trabajo de investigación se caracteriza por ser el primer estudio realizado en Europa con el periodo de seguimiento más largo (39 años), incluyendo el siglo XXI en el estudio, entre enero de 1970 y diciembre de 2009, emplazado en un área urbana de baja prevalencia, como es Barcelona. En relación a la población de referencia, observamos un aumento progresivo del porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP durante los 3 primeros periodos del estudio, siendo máximo en el período (1986-1993) con un 28.84% de incidencia por 100.000 personas-año, mostrando un descenso posterior del 40,41%($p < 0.0001$). En el análisis más detallado, estratificado por grupos de edad, en relación a los periodos del estudio, se ha observado un incremento, siendo máximo en el periodo comprendido entre 1978-1985 para el grupo <45 años, con descenso posterior del 52,1%, sin presentar ningún diagnóstico de EOP en el último período del estudio. De la misma forma, en el grupo de pacientes del grupo de 45-64 años y ≥ 65 años, se observa un aumento en el porcentaje de nuevos diagnósticos siendo máxima en el tercer período (1986-1993) para el grupo ≥ 65 años y en el cuarto periodo (1994-2001) para el grupo 45-64 años, con un descenso más marcado en el grupo de mayor edad, del 49.07% (grupo de ≥ 65 años), respecto al 25,4% (grupo 45-64 años), siendo estadísticamente significativa estas diferencias en ambos grupos ($p < 0.0001$). En cuanto al porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP según el género y estratificados según la edad del diagnóstico en los diferentes periodos del estudio, se observa un comportamiento secular superponible al estudio de la población global. Por lo tanto durante el período de seguimiento, existe un descenso de la incidencia de EOP en los dos últimos periodos de estudio, mostrando una tendencia secular a presentarse con mayor edad en el momento del diagnóstico.

Este hecho se ha observado en España, pero únicamente en una región rural de alta prevalencia como es la comarca de Vitigudino, con un aumento en el porcentaje de nuevos diagnósticos durante los dos primeros periodos del estudio, siendo máximo en el periodo comprendido entre 1992-1997, con un descenso posterior del 40,7% en el grupo de población menor de 45 años y un 31,1% en el grupo de población 45-65 años,

en los dos últimos periodos del estudio, entre 1998 y 2009, pero esta tendencia no se ha detectado en el resto de la provincia de Salamanca, siendo un área urbana similar a la nuestra³¹.

Este patrón de comportamiento epidemiológico contrasta con los estudios poblacionales en diferentes regiones que han mostrado un declive progresivo en la prevalencia e incidencia de EOP en los últimos 35 años como son Reino Unido, diferentes poblaciones europeas, EE.UU, Australia y Nueva Zelanda^{6,24,28,29,30,31,296}. Su frecuencia parece estar disminuyendo de forma más marcada en las regiones conocidas como de alta prevalencia, pero no ocurre lo mismo en todas las zonas analizadas.^{6,28,29,30,31}. Nuestra tendencia secular en relación al porcentaje de nuevos diagnósticos es similar al que se describe en el foco de alta prevalencia de la comarca de Vitigudino y parcialmente, al observado en Italia (Turín), donde se ha constatado un incremento de prevalencia en individuos mayores de 75 años en las últimas décadas (1986-2002), sin objetivarse cambios en los pacientes menores de 75 años²¹. Curiosamente, las prevalencias mantenidas o crecientes en el tiempo, se encuentran probablemente en regiones donde existe un fuerte efecto fundador, es decir, descendientes de un ancestro común, probablemente debido a la presencia más marcada de formas familiares de EOP^{258,255,259,157}. Asimismo se objetivó un aumento significativo de prevalencia (0,42% en 2006 a 1,27% en 2009) en Recife, en el noreste de Brasil, durante el periodo 2006-2009³³. También se ha observado un aumento de incidencia de 6,9/100.000 persona-año en 1950-1959 a 12,6/100.000 persona-año en 1960-1979 en un estudio longitudinal de residentes del condado de Olmsted (Estados Unidos) con una disminución posterior de 5,4/100.000 persona-año en el periodo 1990-1994²⁸. Este registro se caracteriza por presentar el periodo de seguimiento más largo publicado, donde se estudiaron los cambios seculares durante un periodo de 44 años, entre 1950-1994. Nuestro estudio se caracteriza por presentar el periodo de seguimiento más largo descrito en Europa, 39 años comprendidos entre enero de 1970 y diciembre de 2009, donde evidenciamos un aumento de incidencia en los tres primeros periodos del estudio de 3,59/100.000 persona-año en el periodo 1970-1977 hasta alcanzar 28,84/100.000 persona-año en el periodo 1986-1993 con una disminución posterior de 16,96/100.000 persona-año en el último periodo de estudio (2002-2009).

Una de las explicaciones que podemos aportar para el aumento del porcentaje de nuevos diagnósticos de EOP durante el período comprendido entre 1970-1993, siendo más importante en el grupo de mayor edad (≥ 65 años), podrían corresponder tanto a un aumento de supervivencia poblacional como a la utilización de manera rutinaria de técnicas analíticas y de imagen más sensibles, utilizadas para el cribado de esta entidad, aumentando de manera importante los casos no diagnosticados en la población. Otra explicación acerca de un mayor diagnóstico en el grupo de población de mayor edad (≥ 65 años), es debido a que esta enfermedad presenta un porcentaje muy elevado de casos asintomáticos o con un fenotipo al diagnóstico muy leve, pudiendo dificultar su diagnóstico en etapas más tempranas de la enfermedad, y probablemente este grupo de edad puede presentar un control clínico asistencial más estricto por las comorbilidades que pudieran presentar, diagnosticándolos de forma casual.

Y posteriormente el descenso del porcentaje de diagnósticos en todos los grupos edad, en el período comprendido entre 1994-2009, podría ser debido a los flujos migratorios, cambios en el estilo de vida, un estilo de vida más sedentario ocasionando menos sobrecargas mecánicas y menos lesiones óseas, así como una menor exposición a zoonosis y a una mejora en la implementación de programas de vacunación poblacional, a pesar que nuestra población de estudio procede de una área urbana, donde probablemente no haya existido tantas diferencias de exposición a zoonosis durante el periodo de estudio como en un ámbito rural.

Cabe destacar que a pesar de los cambios seculares constatados en relación a la prevalencia e incidencia de la EOP en las últimas décadas, también se ha objetivado cambios en la distribución anatómica de las lesiones óseas, en la edad de presentación en el momento del diagnóstico, así como la severidad o gravedad en el momento del diagnóstico evaluada por la extensión y la actividad de la enfermedad.

La evidencia de una disminución en el número de certificados de defunción por EOP, y en el número de complicaciones atribuidas a esta entidad, así como una merma en la degeneración sarcomatosa, en los últimos once lustros, mostraría de forma indirecta una disminución de la severidad de EOP^{45,46,139}.

En nuestro estudio observamos una disminución de la severidad en el momento del diagnóstico en relación a la extensión y actividad de la enfermedad en función del año del diagnóstico y año del nacimiento. Se mostró una disminución de la severidad de la enfermedad evaluado por el número de localizaciones, distribución gammagráfica,

índice de Coutris, índice anatómico de Renier y múltiplos de FA descritos al diagnóstico en relación a los diferentes periodos de estudio tanto en función del año del diagnóstico como del año de nacimiento, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los periodos de estudio. En el análisis de correlación entre los diferentes índices de severidad como son el número de localizaciones, distribución gammagráfica, múltiplos de FA, índice de Coutris e índice anatómico de Renier, se observó una correlación negativa, estadísticamente significativa en todos los casos, por este motivo se confirma esta tendencia de disminución de la severidad, también objetivada en otras series poblacionales tanto españolas^{22,23,25,31,35} como extranjeras^{28,29,38,45,46,139,296}. Sin embargo, en el estudio español implementado en la provincia de Salamanca, no se objetivó una disminución en la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico evaluado mediante el índice anatómico de Renier, en relación al año de nacimiento ni al año del diagnóstico durante el periodo de estudio, en la comarca de Vitigudino, en cambio en Salamanca, si que se objetivó esta disminución de severidad en relación a la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico³¹. En nuestra serie, a pesar de observarse una disminución de la actividad durante los periodos del estudio evaluada por los múltiplos de FA, como en otras poblaciones estudiadas^{6,31,24,47}, no sé describe estos mismo hallazgos cuando se evalúa mediante el índice de actividad de Renier, no mostrando diferencias significativas en los distintos periodos del estudio tanto en función del año del diagnóstico como con el año de nacimiento. Este hecho también se ha descrito en otra serie española^{22,23}. Cabe destacar que a pesar que la tendencia secular general acerca de la severidad de la enfermedad al diagnóstico, tiende hacia una disminución, al igual que la prevalencia e incidencia^{6,24,28,29,30,31,296}, existen estudios poblacionales que describen aumento en la incidencia y prevalencia^{6,21,27,28,33,31}, incluso en la severidad al diagnóstico en función de los distintos periodos de estudio, como ocurre con Italia^{21,27,36}. En relación a la edad en el momento del diagnóstico, diversos estudios han reportado que la media de edad al diagnóstico se ha incrementado en las últimas décadas. En el estudio epidemiológico de Cundy y col.²⁹ realizado en Nueva Zelanda encuentran que la media de edad en el momento del diagnóstico ha incrementado de 62 a 74 años en función de los diferentes periodos de seguimiento 1973-1975 y 2000-2002²⁹. En nuestra serie hemos observado un aumento de la edad en el momento del diagnóstico, siendo la media de 51 años en el primer período (1970-1977) a 68 años en el último período de

estudio (2002-2009) mostrando una correlación positiva ($p= 0.000$) con el año del diagnóstico. Sin embargo en los estudios poblacionales previos realizados en España, no se objetivaron cambios significativos en relación a la edad en el momento del diagnóstico en función del año del diagnóstico durante los diferentes periodos de estudio^{31,35}. Cabe destacar que al analizar la evolución de la edad del diagnóstico en función del año del nacimiento, encontramos una correlación negativa significativa ($p=0.000$), no siendo superponible a la tendencia descrita en relación al año del diagnóstico, a pesar que hemos objetivado una disminución de la severidad en los últimos periodos del estudio en relación a los índices de extensión y actividad tanto en función del año del diagnóstico como del año del nacimiento, mostrando una correlación negativa en ambos escenarios. Sin embargo, la disparidad observada en el patrón de comportamiento de la edad al diagnóstico en función del año del diagnóstico y del año de nacimiento, nos puede sugerir una información diferente. Probablemente, la correlación negativa descrita entre el año del nacimiento y la edad al diagnóstico, mostrando un patrón que se corresponde con edades al diagnóstico más tempranas en pacientes más jóvenes, nos puede aportar información acerca de un diagnóstico más precoz en los últimos años del estudio. Este diagnóstico más precoz en los últimos periodos del estudio puede ser consecuencia de un acceso más fácil a la asistencia sanitaria, una concienciación o sensibilización de la enfermedad por parte de los médicos de atención primaria con una derivación más temprana a la atención especializada hospitalaria así como la utilización de manera rutinaria de técnicas analíticas y de imagen más sensibles, aplicadas para el cribado de esta entidad. En cambio, la existencia de una correlación positiva entre la edad al diagnóstico y el año del diagnóstico durante el periodo de estudio, nos describe una tendencia a presentar una mayor edad en el momento del diagnóstico durante los últimos periodos del estudio, en consonancia a lo observado en otras poblaciones²⁹, definiendo un fenotipo de la EOP menos severo en los últimos periodos del estudio. Posiblemente este cambio en el patrón de comportamiento de la edad en función del año del diagnóstico, ha podido verse influido por cambios en exposiciones medioambientales con impacto en el inicio o en la gravedad de la enfermedad. Muchos factores ambientales han sido implicados como potenciales desencadenantes de la enfermedad como las dietas pobres en calcio y déficit de vitamina D en la infancia, contacto con perros durante la infancia o juventud¹²⁷, consumo de carne de vacuno no controlada en la infancia¹²⁸ o consumo de aguas

no purificadas²⁵, excesiva carga mecánica sobre el esqueleto, y diversos tóxicos ambientales como el pesticida con arsénico¹²⁹. Sin embargo los factores ambientales implicados con mayor frecuencia han sido los agentes infecciosos, principalmente los virus de la familia Paramyxoviridae (virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus del moquillo canino y los virus de la parainfluenza), siendo el único factor ambiental que se ha estudiado experimentalmente en base a estudios moleculares que han buscado evidencias de infección viral persistente en células y tejidos de pacientes afectos de EOP, con resultados contradictorios, poniendo en duda la validez de esta teoría por múltiples equipos de investigadores¹²⁰. Lamentablemente, no recogimos datos sobre los contactos con animales, vacunas, dietas o exposición a infecciones en nuestra población de estudio, no pudiendo evaluar el papel de los factores ambientales en el patrón del comportamiento de la EOP en nuestra población de estudio.

Al comparar la existencia o no de diferencias significativas entre la edad del diagnóstico y los índices de severidad tanto de extensión como de actividad, observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en las edades extremas, es decir en el grupo <45 años y ≥75 años, mostrando más severidad en el momento del diagnóstico, en relación a los múltiplos de FA, índice de Coutris, índice anatómico de Renier, número de localizaciones y distribución gammagráfica, con predominio de casos poliostóticos. Esta tendencia no se observa en relación al índice de actividad de Renier, como ocurre en los análisis previos con esta variable^{22,23}.

Aunque la EOP puede localizarse en cualquier hueso del esqueleto, en nuestra serie, presenta una predilección por la pelvis (60,31%), c.lumbar (27,3%), fémur (27,23%), cráneo (26,27%), sacro (20,61%), húmero (13,74%), c dorsal (13,94%), tibia (12,72%), similar a la descrita en otras series^{39,58}.

Durante el periodo de seguimiento, en nuestra población se evidencia un cambio en los lugares de afectación en función del año del diagnóstico, se ha observado un descenso en todas las localizaciones, siendo más marcado y estadísticamente significativo en c. lumbar ($p < 0,0165$), dorsal ($p < 0,080$), húmero ($p < 0,0043$), fémur ($p < 0,0002$), tibia ($p < 0,0025$). No evidenciándose modificaciones en la frecuencia de las localizaciones incluidas en la radiografía de abdomen durante el periodo de seguimiento, herramienta diagnóstica en los estudios de prevalencia a nivel mundial. Por lo que no podríamos justificar este descenso de la incidencia en nuestra población por cambios seculares en la afectación de la pelvis.

En la serie que nos ocupa, se objetivó en varones una mayor afectación de c.lumbar ($p=0,0004$), sacro ($p=0,0011$), húmero ($p=0,004$), c.dorsal ($p=0,002$), escápula ($p=0,008$), destacando en la mujer una mayor tendencia de presentación en cráneo ($p=0,0001$), similar a la descrita en otra serie de población española⁴⁰, pero a diferencia de otras poblaciones donde se han objetivado mayor frecuencia de casos monostóticos con afectación tibial en la mujer^{99,210}.

La afectación polioestótica de la EOP es más frecuente que la forma monostótica, tal como muestran diversos estudios^{130,133}. En nuestra serie, el 60.31% mostraron un patrón de EOP polioestótico, y 106 casos presentaron formas monostóticas, con un descenso de los casos polioestóticos y un aumento de los monostóticos en el período de seguimiento, mostrando en el último período del estudio una mayor frecuencia de casos monostóticos respecto a los polioestóticos, al igual que se ha descrito en otras series^{29,210}.

En base a la literatura, las descripciones del número de localizaciones en relación al género han sido dispares según las series, mostrando un aumento de localizaciones afectas en varones¹⁴⁴ o sin predilección en relación al género⁹⁹, o incluso una disminución del porcentaje de afectación esquelética en el sexo masculino respecto al femenino³¹³. En nuestra serie, en relación a las diferencias clínicas en cuanto al género, las mujeres tienen tendencia a una mayor afectación monostótica, con menor número de huesos afectados, con una edad más avanzada al diagnóstico, mostrando una mayor frecuencia en el grupo ≥ 75 años, respecto al hombre. En cuanto a las complicaciones acaecidas durante el curso de la enfermedad, se ha observado una mayor frecuencia de coxartrosis secundarias a EOP y afectación craneal. En contraposición, los hombres tienen una mayor afectación polioestótica con mayor número de localizaciones afectas asociado a una mayor actividad de la enfermedad, sin llegar a la significación estadística. En base a estos hallazgos, en el momento del diagnóstico, las mujeres presentan un fenotipo menos severo que los hombres, manteniendo estas diferencias en los diferentes periodos del estudio, al igual que se observa en la serie de Dunedin (Nueva Zelanda)²⁹.

Cabe destacar que durante los últimos 40 años, se ha observado una tendencia secular hacia una menor severidad al diagnóstico de la EOP, con un aumento en la frecuencia de casos monostóticos al diagnóstico, siendo más marcado en el sexo femenino²⁹. Este incremento de casos monostótico en el momento del diagnóstico se ha llegado a

duplicar en la última década, del 24%²⁹⁰ al 40%²¹, pudiendo conducir a una subestimación de la prevalencia, incluso en ambos sexos, dado que la afectación axial, incluida la pelvis, es menor en los casos monostóticos, lo que conllevaría a un infradiagnóstico en los estudios de prevalencia realizados en base a una radiografía de abdomen.

Las manifestaciones clínicas van a depender de la actividad y de la extensión de la enfermedad, así como de las complicaciones que origina la misma entidad. En relación a las series descritas en la literatura, el porcentaje de pacientes con síntomas atribuibles a la EOP oscila entre un 10-30%^{1,28,39,58,130}, en la que nos ocupa, la cifra es un 5%, inferior a los estudios publicados en la literatura, pudiendo dificultar un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Se ha observado en diferentes estudios, que la existencia de una historia familiar positiva conlleva a un incremento de gravedad en función de la actividad y extensión de la enfermedad al diagnóstico, así como una mayor frecuencia de complicaciones durante el curso clínico de la enfermedad^{39,58,147,249}. El 6.39% de nuestra población presenta antecedentes familiares de EOP, mostrando diferencias significativas en función de la severidad de la enfermedad al diagnóstico, mostrando cifras más elevadas en el índice de Coutris, en el índice de actividad de Renier, en los múltiplos de FA, en el número de localizaciones así como un mayor número de casos poliestóticos, respecto a la población de EOP sin historia familiar positiva. El porcentaje de pacientes con antecedentes familiares en nuestra serie fue menor al reportado previamente en las series de Vitigudino (Salamanca)³¹, Reino Unido²⁶¹ y Estados Unidos¹⁴⁷. En nuestra serie, se han observado diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad entre pacientes con historia familiar positiva y aquellos pacientes sin antecedentes familiares documentados. En cambio, en la serie de Salamanca no se encontraron diferencias significativas en relación a la presencia de una historia familiar positiva entre la comarca de Vitigudino y el resto de la provincia de Salamanca, sin embargo la población de Vitigudino presentaba una enfermedad más severa al diagnóstico en relación a la extensión y actividad de la enfermedad respecto al resto de la provincia de Salamanca. Este hecho plantea la posibilidad que la gravedad de la enfermedad pueda deberse a factores de estilo de vida o a exposiciones ambientales relacionadas con el ámbito rural, como se ha descrito en Italia²⁶, o por la existencia de un efecto fundador, relacionado con la presencia de anomalías genéticas

más frecuentes en las poblaciones con un fenotipo más severo al diagnóstico^{157,255,258,259}.

En relación a las complicaciones acaecidas, en nuestra serie, durante el periodo de seguimiento, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el número de complicaciones y los índices de severidad estudiados, mostrando una correlación positiva estadísticamente significativa, excepto con el índice de actividad de Renier. Por consiguiente, los pacientes que han presentado más complicaciones durante el periodo de seguimiento, se asocian con una enfermedad más extensa (mayor índice de Coutris, mayor índice anatómico de Renier, más frecuencia de casos polioestóticos y mayor número de localizaciones) y más activa, con valores de múltiplos de FA más elevados al diagnóstico, existiendo una correlación positiva entre el número de complicaciones e índices de actividad y extensión en el momento del diagnóstico. Por este motivo y con el fin de identificar factores predictores de mal pronóstico al diagnóstico, es decir aquellos que van favorecer peores desenlaces, como la presencia de mayores complicaciones durante el curso de la enfermedad, y en base al análisis de regresión logística, describimos 5 variables que se asociaron de forma independiente a la presencia de más complicaciones durante el curso de la enfermedad. Las variables independientes identificadas como factores predictores de mal pronóstico fueron el índice anatómico de Renier, el número de localizaciones, múltiplos de FA, la edad al diagnóstico y el género femenino, que en conjunto representaron el 19% de la varianza de presentar complicaciones durante el curso de la enfermedad. Este porcentaje fue ligeramente superior en el estudio de Visconti MR y col, donde identificaron 4 factores predictores independientes al diagnóstico asociados a una mayor gravedad de la enfermedad, siendo la presencia de la mutación en el gen *SQSTM1*, la edad al diagnóstico, la edad en la visita inicial y una historia familiar positiva de EOP, las responsables del 29,1% de la varianza de presentar una mayor gravedad en la enfermedad²⁶¹. Cabe destacar que el tamaño muestral de este estudio fue superior, llevado a cabo en una población de 705 pacientes procedentes de un ensayo clínico (PRISM, ISRCTN12989577), así como el análisis de la mutación en el gen *SQSTM1* en la población de estudio, ambos pudieron mejorar la estimación de la predicción, dado que la presencia de mutaciones en el gen *SQSTM1* se encuentra fuertemente asociada con una mayor severidad de la enfermedad, menor edad al diagnóstico y una mayor

presencia de múltiples complicaciones acaecidas durante curso de la enfermedad^{142,249,261}.

Por consiguiente, el cálculo de ambas ecuaciones, tanto la procedente de nuestro estudio como la de Visconti MR y col²⁶¹, nos va a permitir realizar un análisis al diagnóstico en nuestros pacientes del posible riesgo de complicaciones que puede acontecerles durante el curso de su enfermedad, por consiguiente la implementación de esta estrategia podría mejorar la toma de decisiones en el escenario clínico-terapéutico.

Nuestro estudio clínico-epidemiológico tiene varias limitaciones. Es evidente la dificultad que presenta la interpretación de los cambios seculares evidenciados en nuestra área, debido a la existencia de variaciones demográficas, metodológicas y en la práctica clínica habitual en relación a la estrategia clínico-diagnóstica-terapéutica, durante el período de seguimiento. Asimismo nuestra serie está implementada en una consulta monográfica especializada de referencia, de ámbito urbano, dependiente de las derivaciones procedentes tanto de atención primaria como de los distintos servicios médicos afines del propio hospital, por lo tanto podría estar sujeta a un sesgo de selección, no solo por cambios en los protocolos de derivación sino también por las posibles variaciones en la sensibilidad de la metodología diagnóstica en la detección de casos. A este escenario se suma el infradiagnóstico de las formas silentes de la EOP, dado que la mayoría de los pacientes son asintomáticos y su acceso al sistema sanitario es minoritario, pudiendo subestimar la verdadera incidencia de la EOP.

Los puntos fuertes de este estudio incluyen el tamaño de la cohorte, el largo periodo de reclutamiento con una evaluación clínico-biológica e iconográfica detallada y estandarizada, así como el análisis molecular y las correlaciones genotipo-fenotipo realizadas.

En general el tamaño muestral de nuestro estudio fue suficiente, a pesar de la existencia de variaciones en el número de pacientes entre los diferentes periodos del estudio, este hecho no generó una reducción en el poder de detección de cambios seculares en relación a las variables analizadas en función de la incidencia y severidad de la enfermedad durante todo el periodo de seguimiento, incluso se objetivaron diferencias en relación al género.

6.2. Estudio de alteraciones moleculares en el gen *SQSTM1* (p62) e identificación de variantes polimórficas en los genes *TNFRSF11B* (*OPG*) y *TNFRSF11A* (*RANK*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget.

Desde hace años el estudio de los factores implicados en la etiología de la EOP, ha constituido un área de investigación muy activa, se han propuesto múltiples hipótesis, pero a día de hoy, este enigma permanece sin descifrar. Se considera actualmente una enfermedad compleja, multifactorial con participación de forma sinérgica de factores ambientales y genéticos. A pesar que el gen que ha mostrado mayor susceptibilidad es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*)¹⁵⁸, las mutaciones descritas en él no explicarían de forma completa la patogenia de la EOP, dado que estas mutaciones no se encuentran en la mayor parte de los pacientes^{123,160}. Además, las mutaciones del gen *SQSTM1* muestran una penetrancia incompleta, enfatizando el papel de los factores ambientales y de otros genes modificadores, en la etiología de la enfermedad. Por lo que a día de hoy, se continúa investigando la existencia de mutaciones en otros genes asociados a esta entidad, debido a la heterogeneidad genética que presenta^{279,124}. Los candidatos más claros son aquellos que, al igual que el gen *SQSTM1/p62*, están relacionados con la osteoclastogénesis.

6.2.1. Estudio de asociación de polimorfismos en los genes *TNFRSF11A* (*RANK*) y en el *TNFRSF11B* (*OPG*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget

El sistema RANKL/RANK/OPG constituye una vía de señalización clave en la determinación del balance del remodelado óseo, siendo un sistema de comunicación intercelular que regula especialmente la osteoclastogénesis^{89,96}. El equilibrio entre OPG y RANKL y la unión de este último a su receptor RANK es clave en la determinación del estado anabólico o catabólico del hueso. Una alteración en dicho sistema de señalización RANKL/RANK/OPG provocaría una desregulación del remodelado óseo y como consecuencia estados patológicos que afectan principalmente al metabolismo óseo como en la EOP²⁸⁰. La identificación de mutaciones en componentes de esta vía de señalización RANK/RANKL/OPG en sujetos con enfermedades óseas hereditarias caracterizadas por un aumento del recambio óseo, con fenotipos similares a la EOP clásica, así como su implicación en la osteoclastogénesis y por ende en la regulación del remodelado óseo, ha permitido centrar la atención investigadora en la búsqueda de genes candidatos asociados al desarrollo de la EOP clásica, en estos dos genes

TNFRSF11A y *TNFRSF11B* que codifican la proteína RANK y la proteína OPG, respectivamente^{154,285-288}. Sin embargo a pesar de los esfuerzos realizados en la identificación de mutaciones en estos locus en el desarrollo de la EOP clásica, los estudios genéticos realizados no mostraron resultados positivos, excluyendo ambos genes como causa de EOP clásica^{154,285-288}. Posteriormente y en base a diferentes estudio genéticos de asociación, e incluso a dos estudios de genoma completo (GWAS) se identificaron asociaciones de diferentes polimorfismos del gen *TNFRSF11A* y del gen *TNFRSF11B* con distintas poblaciones afectas de EOP clásica^{161,162, 286,299,300,317}.

En nuestro estudio de asociación genético de diferentes polimorfismos localizados en ambos genes *TNFRSF11A* (RANK) y *TNFRSF11B* (OPG), hemos observado la existencia de asociación entre las distintas variantes genéticas y el riesgo de desarrollar EOP clásica.

El gen *TNFRSF11A* se encuentra situado en el cromosoma 18q22.1 y codifica la síntesis de una glicoproteína transmembrana de tipo I denominada RANK, de 616 aminoácidos, expresada a partir de un transcrito de 4521 pb compuesto por 10 exones³⁰⁴. La proteína RANK juega un papel esencial en la diferenciación, función y supervivencia de los osteoclastos y por ende, en la resorción ósea^{188,280}. Los ratones Knockout para RANK mostraban una osteopetrosis severa, debido a la ausencia completa de osteoclastos, mostrando un grave defecto en la resorción ósea^{188,280}. El gen *TNFRSF11A* fue inicialmente implicado en la patogenia de la EOP mediante estudios genéticos de ligamiento, en base a la descripción de varios trastornos óseos hereditarios que presentaban una superposición fenotípica con la EOP clásica, a pesar que la edad de inicio era más temprana y mostraban una mayor severidad en el fenotipo²⁸¹. Estas osteopatías hereditarias como son la osteólisis expansiva familiar (FEO), el paget juvenil, la hiperfosfatasa expansiva esquelética (ESH) así como el síndrome panóstotico óseo expansivo, están causadas por mutaciones de inserción de entre 12 a 27 pb en el exón 1 del gen *TNFRSF11A*²⁸¹. A pesar de estas evidencias, hasta el momento, no se han identificado mutaciones del gen *TNFRSF11A* en pacientes con EOP clásico^{283,286}. En relación a los estudios de asociación de polimorfismos del gen *TNFRSF11A* y EOP clásica, realizados en diferentes poblaciones geográficas se han identificado diferentes variantes genéticas como son rs1805034 (c.T575C, p.V192A en el exón 6) y rs35211496 (c.C421T, p.H141Y en el exón 4) en el gen *TNFRSF11A* que predisponen a EOP, así como los SNPs identificados en los

estudios de genoma completo, localizados en regiones intergenéticas próximas al extremo 3' del gen *TNFRSF11A* como son rs3018362 y rs2957128^{161,162,166,317}.

Uno de los objetivos de nuestro estudio era analizar el posible papel de las distintas variantes genéticas tanto en el desarrollo de EOP como en la caracterización de su fenotipo. En base al genotipado de 10 SNPs del gen *TNFRSF11A* previamente seleccionados de acuerdo con la información procedentes de las diferentes bases de datos públicas ampliamente utilizadas. Se identificaron tres polimorfismos asociados a la población de pacientes afectados de EOP, siendo uno de los tres polimorfismos asociados, un cambio “*missense*”, ocasionando un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína, mientras que los otros dos polimorfismos se localizaron en secuencias no codificantes (región intergenética e intrónica).

El polimorfismo RANK rs1805034 (c.T575C, p. V192A), localizado en el exón 6, se ha encontrado significativamente asociado con la enfermedad en el modelo de herencia dominante, codominante y overdominante en nuestra población estudiada. Se ha observado que este polimorfismo rs1805034 presenta diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica entre pacientes con EOP y controles. Por tanto, ser portador del alelo C se asoció con un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad. Asimismo se observó un incremento del 43% al 89% del riesgo de desarrollar EOP si se asociaba la presencia de la mutación P392L del gen *SQSMT1*. Este hallazgo ha sido descrito en el estudio de asociación genética realizado en una población italiana¹⁶⁶, donde se observó un aumento de riesgo de presentar EOP del 29%, el ser portador del alelo C, siendo este efecto mayor, con un incremento del 71% si se asociaba la presencia de la mutación *SQSMT1* positivo. A diferencia de los resultados de nuestro análisis, donde solo se observó significación estadística en el subgrupo de pacientes portador de la mutación *SQSMT1* P392L+ y no en el subgrupo de pacientes procedente de la población portadora de las distintas mutaciones descritas en el gen *SQSMT1* en nuestro estudio, sin embargo en el estudio italiano la población portadora de mutaciones en el gen *SQSMT1* que describen asociada, es diferente a la nuestra, dado que presentan once mutaciones en el gen (Y383X, P387L, P392L, E396X, M401V, M404V, G411S, D423X, G425E, G425R, A427D) con posibles efectos de asociación diferentes entre las distintas mutaciones²⁷⁹.

La correlación genotipo-fenotipo constató que los portadores del alelo C presentaban una mayor actividad al diagnóstico con mayores niveles de múltiplos de FA, mayor

extensión de la enfermedad con un mayor número de localizaciones óseas afectadas al diagnóstico y un porcentaje más elevado de casos polioestóticos, así como un mayor número de complicaciones siendo la deformidad la más frecuente. Por consiguiente, ser portador del alelo C se asoció a un fenotipo más severo al diagnóstico en función de los marcadores de actividad y de extensión de la enfermedad así como la presencia de mayores complicaciones durante el curso de la EOP. En la población italiana¹⁶⁶, también se observaron resultados similares en relación a la extensión de la enfermedad, es decir, ser portador del alelo C se asoció a una mayor prevalencia de casos polioestóticos y a un mayor número de localizaciones óseas afectadas, pero no se observaron una mayor actividad de la enfermedad ni mayores complicaciones durante el curso de la misma¹⁶⁶.

Este polimorfismo no sinónimo del gen *TNFRSF11A* se caracteriza por presentar un cambio de valina a alanina en el codón 192 (V192A) localizado en el exón 6 (rs1805034, c.T575C). En el estudio de conservación interespecie de diversos organismos, se observó que V192 es un aminoácido conservado evolutivamente en mamíferos, lo que sugiere una implicación importante en la función de la proteína RANK. En base a los algoritmos de predicción del posible impacto del polimorfismo “*in silico*” evaluado mediante las herramientas bioinformáticas SIFT y Polyphen-2, categorizan al polimorfismo rs1805034 como “deletéreo” y “seguramente perjudicial”, respectivamente. Este polimorfismo no sinónimo, se encuentra localizado en una región codificante del gen *TNFRSF11A*, en la región extracelular de la proteína RANK (residuos 30-194), en el dominio de pseudorrepetición rico en cisteína (TNF_CYS_RICH_REG, CDR), siendo el dominio CDR4 (residuos 155-197) la ubicación de esta variante V192A.

Estos dominios son característicos de los miembros de la familia TNFRSF (superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral)³¹⁸ y cruciales en la interacción específica entre el ligando y el receptor, es decir entre RANKL y RANK, dependiendo sobre todo de los dominios CDR2 y CDR3. Sin embargo, se ha observado que el dominio CDR4, no regula físicamente la unión con la proteína RANKL, pero es importante para mantener la integridad estructural del receptor y regular la transmisión de información al interior celular, por tanto mutaciones en esta región se han asociado con cambios conformacionales locales y funcionales de la proteína RANK con implicaciones en la osteoclastogénesis³¹⁹. Por consiguiente, en base a los estudios funcionales descritos en la literatura^{318,319}, este polimorfismo presenta un efecto deletéreo sobre el

funcionamiento de la proteína RANK, ocasionando una hiperactivación de la señalización de la vía NF- κ B, con efecto sobre la actividad y supervivencia de los osteoclastos. Por lo tanto, el incremento de riesgo de presentar EOP y la severidad del fenotipo al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad asociado a la presencia del polimorfismo RANKrs1805034 observado en nuestro estudio, podría corroborar los hallazgos procedentes de los estudios funcionales descritos previamente^{318,319}.

La variante genética RANK rs3018362 (A>G) localizada en la región intergenética, en una posición localizada próxima al extremo 3' en la región downstream del gen *TNFRSF11A*. Este polimorfismo se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar la EOP en función de los modelos de herencia dominante, codominante y "log-additive", observándose diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica entre pacientes con EOP y controles. Ser portador del alelo A del polimorfismo RANK rs3018362 se asoció con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, con un riesgo estimado de un 43%, respecto a los controles. No se objetivó un incremento de riesgo de presentar EOP, la asociación del polimorfismo RANK rs3018362 a la mutación *SQSMT1*, lo que nos sugiere que esta variante tiene un menor impacto sobre la patología mientras que el hecho de tener una mutación en el *SQSMT1* prevalecería el efecto de dicha mutación.

En función de la correlación fenotipo-genotipo, se observó una asociación del alelo A con la población de pacientes que presentaban una menor edad al diagnóstico, un mayor número de localizaciones, mayor actividad de la enfermedad en relación a niveles más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como un mayor número de tratamientos realizados, mostrando significación estadística.

La asociación observada en nuestro estudio acerca del alelo A del polimorfismo rs3018362 (A>G) ha sido descrita previamente en el estudio a gran escala de genoma completo realizado en la población afecta de EOP, donde se objetivó una asociación con el incremento a presentar EOP¹⁶². También se ha descrito en la literatura asociado a una densidad mineral ósea disminuida con un mayor riesgo de osteoporosis preferentemente en la columna lumbar en mujeres postmenopáusicas portadoras de los genotipos GA y AA²⁰⁸. En cambio en la población china, ser portador del alelo G del polimorfismo rs3018362 se encuentra asociado con una disminución de la densidad mineral ósea en mujeres peri y postmenopáusicas²³⁶. Por consiguiente y ante las evidencias descritas en la literatura^{162, 208, 236}, este alelo podría estar relacionado con un

aumento del remodelado óseo, pero serían necesarios más estudios moleculares para confirmar este hallazgo.

En función de los algoritmos de predicción funcionales “*in silico*”, se ha observado que el alelo A del polimorfismo rs3018362 se asocia a un cambio funcional del factor de transcripción NFATc1 (células T activadas por factor nuclear c1). Este factor de transcripción, NFATc1, juega un papel importante en la diferenciación de los osteoclastos, mediante la regulación de una serie de genes específicos de los osteoclastos como son TRAP, catepsina K, receptor de calcitonina y receptor asociado a osteoclastos (OSCAR) mediante la cooperación con MITF (factor de transcripción de microftalmia) y c-Fos²¹¹. El papel de NFATc1 en la diferenciación de osteoclastos ha sido bien establecido por varios estudios realizados en modelos animales, donde se ha observado que los ratones knockout para NFATc1 presentan un fenotipo óseo de osteopetrosis debido a un defecto severo en el proceso de osteoclastogénesis²¹¹. Por lo tanto, variaciones genéticas como el polimorfismo rs3018362 que influyan en la regulación de NFATc1 en los osteoclastos puede alterar la diferenciación de los mismos y por ende, favorecer una osteoclastogénesis defectuosa, base patogénica del desarrollo de la EOP.

El polimorfismo RANK rs6567274 (T>G), localizado en la región intrónica (intrón 9) del gen *TNFRSF11A*, se ha relacionado con una disminución del riesgo de desarrollar EOP, mostrando significación estadística en los modelos codominante, “log-additive” y recesivo. Se han encontrado diferencias significativas en la distribución genotípica y alélica del polimorfismo RANK rs6567274 entre pacientes afectados de EOP y controles. Ser portador del genotipo TT y del alelo T se asoció con una disminución de riesgo a desarrollar la enfermedad. Se ha observado una disminución mayor del riesgo a presentar EOP, cuando el alelo T se asocia a la presencia de la mutación *SQSMT1* tanto en el subgrupo de pacientes portadores de la mutación *SQSMT1* P392L+ como en la población de pacientes portadores de cualquier mutación en el gen *SQSMT1* descrita en nuestro estudio, por consiguiente, ser portador del alelo T de forma independiente o asociado a la mutación *SQSMT1*, supondría una protección frente al desarrollo de la EOP.

En el estudio de correlación genotipo-fenotipo, se observaron diferencias estadísticamente significativas, ser portador del genotipo TT, se asoció a una mayor edad al diagnóstico, así como a un menor número de complicaciones durante el curso

de la enfermedad siendo la artropatía por vecindad, la complicación menos frecuente asociada a la EOP. Por consiguiente, el polimorfismo RANK rs6567274, se asocia a un menor riesgo de desarrollar EOP, así como a un fenotipo más leve.

Este es el primer estudio en el que se describe este polimorfismo RANK rs6567274 (T>G) asociado a la EOP, mostrando un efecto protector en el desarrollo de la misma. Sin embargo, en la literatura científica se ha descrito que ser portador del alelo T de esta variante genética se asocia a individuos con estatura más alta en función de los modelos de herencia “log-additive” y recesiva, en una población caucásica²³⁰. Probablemente la localización de este polimorfismo cerca de la región 3'UTR del gen *TNFRSF11A*, podría sugerir un efecto anómalo en la regulación de la expresión del gen, posiblemente secundario a un mecanismo de splicing alternativo anómalo²³⁰.

El gen *TNFRSF11B*, localizado en el cromosoma 8q24.12, codifica la síntesis de una glicoproteína de 401 aminoácidos denominada OPG, expresada a partir de transcrito de 2345 pb constituido por 5 exones. La OPG previene la unión de RANKL a RANK en osteoclastos y por ende, inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos, siendo un regulador clave en la formación de osteoclastos y en la resorción ósea osteoclástica^{85,87,281,289}. Reflejando este hecho, en modelos animales, los ratones con la sobreexpresión de OPG desarrollan osteopetrosis debido al fallo en la formación de osteoclastos mientras que los ratones knockout para la OPG desarrollan osteoporosis y fracturas, causado por un aumento del recambio óseo. Se ha observado que la existencia de mutaciones en regiones codificantes del gen *TNFRSF11B*, ocasiona la pérdida de función de dicha proteína. Dicha disfunción de la proteína OPG se ha descrito asociada a la enfermedad ósea de Paget Juvenil (JPD)^{281,282}, caracterizada por la presencia de mutaciones recesivas que acontecen una pérdida de función o delecciones del gen *TNFRSF11B*, ocasionando una síntesis deficiente o ausencia de la OPG funcional, es decir, la inactivación completa de la proteína y por ende una activación sin contrarregulación de la señalización de RANK a nivel óseo y en otros tejidos, como el sistema cardiovascular. El fenotipo de la JPD es diferente a la EOP clásica, se presenta en la infancia ocasionando deformidades óseas generalizadas y progresivas con dolor, déficit en el desarrollo con estatura baja, aumento progresivo del perímetro craneal, deformidad de huesos largos, dificultad en deambular, *pectus*

carinatum (“pecho de paloma”), debilidad muscular y pérdida temprana de la dentición^{281,291,160,293}

Desde la primera descripción clínica de la JPD^{294,295} donde se identifica una delección homocigótica de 100 kb que afectaba al gen *TNFRSF11B*, causando déficit de OPG con concentraciones circulantes séricas indetectables y por ende el origen de esta entidad JPD. Hasta la fecha, se han identificado diferentes mutaciones homocigotas que afectan a regiones codificantes del gen *TNFRSF11B* en diferentes familias afectas de JPD³²⁰⁻³²³, que ocasionan una deficiencia o ausencia de la OPG funcional.

A pesar de las diferentes mutaciones descritas en el gen *TNFRSF11B* asociadas a la JPD, se planteó la posibilidad de evaluar si variantes génicas en este locus podrían predisponer a la EOP clásica, pero los estudios genéticos realizados no mostraron resultados positivos, es decir, no se identificaron mutaciones asociadas, por lo que fue excluido este gen como causa de EOP clásica^{154,285-288}. A pesar de estos hallazgos, diferentes polimorfismos del gen *TNFRSF11B*^{286,299,300}, se han descrito asociados con la EOP clásica como el SNP 505C>T localizado en el intrón 2²⁸⁶, el rs2073618 (1181G>C) en el exón 1, así como el rs2073617 (905T>C) en la región (-223bp) 5’UTR del gen *TNFRSF11B*^{301,302}, con mayor significación en la asociación en la población de mujeres³⁰². Posteriormente se llevaron a cabo dos estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en la población afecta de EOP, no evidenciando asociaciones significativas entre variantes génicas de este gen y la población de estudio EOP^{161,162} aunque no se realizó un subanálisis en relación al género. Por consiguiente en la actualidad, es incierta la posible asociación del gen *TNFRSF11B* con la población EOP clásica.

En nuestro estudio de asociación de polimorfismos del gen *TNFRSF11B* (OPG) en pacientes afectos de EOP, se genotiparon 11 polimorfismos previamente seleccionados de acuerdo con la información procedente de las diferentes bases de datos públicas ampliamente utilizadas, observando la existencia de asociación entre el polimorfismo OPG rs11573871 (A>G) con el riesgo a desarrollar EOP clásica, en función del modelo codominante, respecto a los controles. Cabe destacar que la falta de representación del genotipo AA en nuestra población de pacientes de EOP como en los controles, ha dificultado la realización del estudio de asociación con los diferentes modelos de herencia.

En relación al polimorfismo OPG rs11573871, situado en la región intrónica (intrón 1) del gen *TNFRSF11B*, hemos observado diferencias significativas en la distribución genotípica y alélica entre pacientes con EOP y controles. Ser portador del genotipo AG y del alelo A del polimorfismo OPG rs11573871 se asoció con un aumento de riesgo a desarrollar la enfermedad. Sin embargo, no se objetivó un incremento de riesgo de presentar EOP, la asociación del polimorfismo OPG rs11573871 a la presencia de la mutación *SQSM1* positiva.

En relación a la distribución genotípica del polimorfismo OPG rs11573871, en función de las diferentes variables clínico-demográficas en la población de EOP, se observaron diferencias significativas. Ser portador del genotipo AG, se asoció a pacientes con menor actividad de la enfermedad al diagnóstico y ausencia de casos de Paget craneal. Por consiguiente ser portador del genotipo AG podría no solo incrementar el riesgo de presentar EOP si no también influir en un fenotipo más leve con menor actividad de la enfermedad al diagnóstico e incluso la no afectación de la localización craneal.

Este polimorfismo OPG rs11573871, ha sido descrito previamente asociado a la EOP en una población belga³⁰², mostrando significación estadística con una OR 1.854 (IC95% 1,011-3,398, p=0.004), incrementándose este riesgo a desarrollar EOP en la población de mujeres (OR 2,890, p=0.038).

El polimorfismo OPG rs11573871 afecta a la región intrónica (intrón 1) del gen *TNFRSF11B* en todas sus isoformas. En función de los algoritmos de predicción funcional "*in silico*", se ha observado que el cambio del alelo G por A del polimorfismo rs11573871 favorece la generación de un posible patrón de *splicing* que es reconocido por una proteína reguladora del RNAm, Qk1, implicada en procesos de diferenciación celular, mostrando significación estadística. Sin embargo, el reconocimiento del sitio de *splicing* por la proteína Qk1, no se efectúa cuando se encuentra el alelo ancestral, dado que no se encuentra dicha localización en la secuencia original. Por consiguiente, la posibilidad de generar un posible patrón *splicing*, modificando la estabilidad del RNA, no existente en la secuencia original, podría favorecer una alteración en la proteína OPG, dando lugar a una proteína no funcional y en consecuencia incrementar el riesgo de presentar EOP. Las predicciones son bastante aproximadas por la significación estadística descrita y por el grado de significancia observada en el estudio de asociación, pudiendo indicar un cambio biológico de cierta magnitud, pero serían necesarios estudios experimentales complementarios para demostrar dicha hipótesis.

El estudio de epistasis nos va a permitir el estudio de interacciones entre genes, es decir, la interacción entre diferentes variables independientes en un determinado fenotipo, con el objetivo de explicar gran parte de la variación fenotípica que muestran las enfermedades complejas, así como identificar las variables genéticas que están relacionadas o influyen o modulan el efecto de otras variables, contribuyendo en el riesgo de padecer una determinada enfermedad. En los últimos años se han desarrollado varios métodos estadísticos para identificar interacciones epistáticas entre variantes genéticas. Sin embargo, debido a las casi innumerables posibilidades de combinaciones en la búsqueda de interacciones, a menudo la eficiencia del software utilizado no es suficiente para poder evaluar todas las posibles interacciones entre genes y SNPs. En nuestro estudio utilizamos un análisis de regresión logística incluyendo cada uno de los posibles pares de SNPs, mediante la librería “SNPassoc” del software R (versión 2.15.0 para Windows). Los SNPs incluidos en el estudio de epistasis fueron: rs1805034 (*RANK*), rs3018362 (*RANK*), rs6567274 (*RANK*), rs11573871 (*OPG*), rs104893941 (*SQSMT1*), aquellos correspondientes a los que se observó una asociación estadísticamente significativa en relación al riesgo de desarrollar EOP. Se identificaron 5 interacciones entre los diferentes genes estudiados, mostrando un incremento del riesgo de desarrollar EOP. Este incremento del riesgo es mayor cuando se combinan diferentes polimorfismos en distintos genes respecto al efecto individual de cada polimorfismo en relación al riesgo de desarrollar EOP. Se ha observado que la combinación de SNPs con mayor fuerza de asociación, es decir que presentan una Odds ratio mayor, en relación con el riesgo de desarrollar EOP, se identifica en las interacciones entre el alelo A del polimorfismo OPG rs11573871 con el alelo C del polimorfismo RANK rs1805034, entre el alelo C del polimorfismo RANK rs1805034 y el alelo T del polimorfismo SQSMT1 rs104893941, y entre el alelo T del polimorfismo SQSMT1 rs104893941 y el alelo A del polimorfismo OPG rs11573871.

En el estudio de epistasis hemos introducido el polimorfismo rs104893941 del gen *SQSMT1*, considerada la mutación p. P392L, siendo la variante genética que ha presentado mayor asociación con la EOP descrita en la literatura^{58,157}. Con la introducción de esta variante en el análisis de interacciones pretendimos conocer si podía existir una interrelación entre los tres genes del estudio que pudiera contribuir a un mayor riesgo de desarrollar EOP, confirmando con los resultados “*in silico*” esta hipótesis. Posteriormente se llevo a cabo el análisis “*in silico*” de la epistasia

funcional, analizando todas las interacciones de los polimorfismos estudiados mediante un modelo genético no paramétrico, MDR (Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial, www.epistasis.org), alternativo a la regresión logística para la detección y la caracterización de interacciones entre los polimorfismos no lineales, donde se observó una mayor significación estadística en la combinación de los polimorfismos rs104893941 (*SQSMT1*) y rs11573871 (*OPG*) así como en la combinación de los polimorfismos rs1805034 (*RANK*) y rs11573871 (*OPG*) en el riesgo a desarrollar EOP, confirmando los resultados del análisis previo. A pesar que las combinaciones se han identificado en genes diferentes, su efecto podría ser acumulativo en relación al aumento de probabilidad de presentar la EOP así como podría influir en la variabilidad del fenotipo al diagnóstico. Hasta el momento, no tenemos constancia en base a la literatura, de la realización de análisis funcionales derivados de los estudios de epistasis de los diferentes genes analizados en nuestro estudio, en la población de EOP, así como tampoco otros estudios de interacciones de otros genes vinculados a la etiopatogenia de EOP.

6.2.2. Estudio molecular del gen *SQSMT1* (*p62*) en pacientes con enfermedad ósea de Paget.

En la actualidad, la EOP es considerada una enfermedad compleja, multifactorial con participación de forma sinérgica de factores ambientales y genéticos. El componente genético explicaría ciertos rasgos epidemiológicos como la predisposición a desarrollarse en determinados grupos étnicos y la fuerte tendencia a la agregación familiar. Entre el 15 y el 40% de los pacientes presentan una historia familiar positiva^{39,145,146} y se ha observado que el riesgo relativo de desarrollar la enfermedad ha sido estimado en 7 veces superior entre los familiares de primer grado de pacientes con la enfermedad respecto a la población general¹⁴⁷, mostrando un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta que aumenta con la edad, con una alta penetrancia a partir de sexta década^{145,148,149}

En nuestro estudio de 200 pacientes con diagnóstico confirmado de EOP, 19 pacientes (9,5%) presentaban una historia familiar positiva y 181 paciente (90,5%) se consideraron esporádicos en base a la anamnesis del paciente. El porcentaje de pacientes con antecedentes familiares en nuestra serie, es menor a la descrita en la literatura^{39,145,146}, probablemente por del desconocimiento de la enfermedad por parte

de los pacientes y de su existencia en sus familiares de primer grado, dado el porcentaje tan elevado de casos asintomáticos que dificultan el diagnóstico, así como la dificultad en el rastreo de la enfermedad en las propias familias, debido principalmente a la mayor edad de los progenitores de los pacientes.

En base a la literatura, el gen mayormente asociado a esta enfermedad, y que ha mostrado mayor susceptibilidad es el Sequestosoma-1 (*SQSTM1*)¹⁵⁸, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35) y codifica la proteína p62. El gen *SQSTM1* juega un papel importante en la cascada de señalización celular relacionada con la osteoclastogénesis a través del NF-κB¹⁵⁹. Se ha descrito que entre el 20-40% de los pacientes con antecedentes familiares y entre el 5-10% de los pacientes de carácter esporádico son portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1*, según las series estudiadas^{159,160}.

El porcentaje de pacientes portadores de mutación en el gen *SQSTM1*, fue del 27% (54 pacientes) en nuestra serie, 7 pacientes (37%) presentaban una historia familiar positiva y 47 pacientes (26%) eran de carácter esporádico. El porcentaje de pacientes con antecedentes familiares portadores de mutación en el gen *SQSTM1* de nuestra población coinciden con lo descrito en la literatura^{159,160}. Sin embargo, describimos un porcentaje de mutaciones más elevado en los casos esporádicos, probablemente por la dificultad en el rastreo de familiares afectos, basándonos únicamente en la anamnesis de los pacientes para el cribado de una historia familiar positiva.

Se han identificado 17 mutaciones en las regiones codificantes del gen (R161W, H163Y, K238E, H261H, G262R, S272S, E274D, D292D, R312R, S318S, R321C, P348P, Y383X, P392L, Q400X, M404V, G405S), seis de ellas se consideran mutaciones sinónimas, donde existe un cambio de un nucleótido pero no cambia el aminoácido original, dos mutaciones “*nonsense*”, donde la variante produce un codón de stop prematuro que trunca la proteína y 9 mutaciones “*missense*”, donde el cambio de un nucleótido genera el cambio de un aminoácido. Tanto las mutaciones “*missense*” como las que generan un codón de stop prematuro, van a favorecer cambios estructurales y funcionales de la proteína, por tanto van a influir de una forma más directa en la fisiopatología de la EOP.

Las mutaciones “*missense*” y “*nonsense*” en el gen *SQSTM1* se describen en función de la presencia de una historia familiar positiva o negativa. 7 pacientes (37%) con antecedentes familiares eran portadores de las siguientes mutaciones: 5 (72%)

pacientes son portadores de la mutación p.P392L (p.Pro392Leu), un paciente (14%) portador de la mutación p. E274D (p.Glu274Asp) y otro paciente (14%) presentaba de forma simultánea la mutación p.P392L (p.Pro392Leu) asociada a la mutación p. E274D (p.Glu274Asp). Se identificaron 47 pacientes (26%) esporádicos portadores de distintas mutaciones en el *SQSM1*, dichas mutaciones se detallan a continuación: 1 paciente (2%) portador de la mutación p.R161W (p.Arg161Trp), 1 paciente (2%) de la mutación p.H163Y (p.His163Tyr), 1 pacientes (2%) de la mutación p.K238E (p.Lys238Glu), 1 paciente (2%) de la mutación p.G262R (p.Gly262Arg), 3 pacientes (6%) de la mutación p.E274D (p.Glu274Asp), 34 pacientes (72%) portadores de la mutación p.P392L (p.Pro392Leu), 4 pacientes (8%) portadores de la mutación p.M404V (p.Met404Val), 1 paciente (2%) de la mutación p.G405S (p.Gly405Ser), 1 paciente (2%) de la mutación p.Y383X (p.Tyr383*), 1 paciente (2%) de la mutación p.Q400X (p.Gln400*) y 3 pacientes (6%) son portadores de mutaciones compuestas en heterocigosis (p.H163Y (p.His163Tyr) asociada a p.P392L(p.Pro392Leu), p.K238E (p.Lys238Glu) asociada a p.E274D(p.Glu274Asp) y p.R321C (p.Arg321Cys) asociada a p.P392L(p.Pro392Leu). Todos los pacientes eran portadores de las mutaciones en heterocigosis y 4 de ellos presentaban mutaciones heterocigotas compuestas, sin observarse más gravedad en el fenotipo respecto a los pacientes portadores de una mutación única, al igual que se describe en la literatura, tanto en pacientes con historia familiar positiva como en esporádicos^{142,260, 261}.

Hasta el momento, se han descrito en la literatura 28 mutaciones en el gen *SQSTM1*, 21 de ellas son mutaciones “*missense*” que ocasiona un cambio de un aminoácido y las otras 7 mutaciones conducen a una proteína truncada⁵⁸. El 86% de las mutaciones se agrupan dentro del dominio UBA de la proteína p62, hecho que conlleva la desregulación de la ruta de señalización RANK-TRAF6-NFkB, con un aumento de actividad del NF-kB, así como una pérdida de capacidad de unión a proteínas ubiquitinadas^{142,255,256,257,265}. La mayor parte de las mutaciones descritas en el gen *SQSM1* se localizan en el dominio UBA (aminoácidos 386-440) en la región carboxiterminal de la proteína p62, probablemente constituye una región de puntos calientes o “hotspot” con una tasa elevada de recombinación, debido a una inestabilidad inherente en la secuencia del DNA, que favorece una mayor frecuencia de mutaciones.

En nuestro estudio se han identificado 4 mutaciones en el exón 8 que codifica el dominio UBA de la proteína p62: p.P392L, p.Q400X, p.M404V, p.G405S, tres de ellas han sido descritas previamente en la literatura^{58,157,251,261,260}. La mutación p.G405S es la primera vez que se describe asociada a la EOP y dada la falta de información acerca de esta mutación en las bases de datos genéticas, realizamos un análisis funcional de esta variante “*in silico*” mediante la implementación de herramientas bioinformáticas de predicción como SIFT y Polyphen-2, donde categorizan a esta variante como “seguramente perjudicial” por Polyphen y “deletérea” por SIFT.

Hasta el momento, se han descrito 2 mutaciones contiguas a la descrita en la posición 405 asociadas a la EOP, como son la p.M404T y p.M404V^{251,260}. La mutación p.M404V también ha sido identificada en 4 pacientes sin historia familiar positiva, en nuestra serie. En base a la literatura, en el codón 404 se han identificado dos mutaciones, la mutación p.M404V y la p.M404T localizadas en el nucleótido +1250 (A>G) y, en el nucleótido +1251 (T>C) del cDNA del gen *SQSTM1*, respectivamente^{251,260}. La mutación M404V se localiza en la región hidrofóbica del dominio UBA y es capaz de modificar la estructura secundaria del dominio UBA, pudiendo afectar a su capacidad para unir las cadenas de poliubiquitina a Lys48, alterando la unión de la proteína p62 con las proteínas ubiquitinadas²⁶³.

La variante genética “*missense*” p.G405S (Gly405Ser) se describe en heterocigosis en un paciente varón de carácter esporádico y con clínica al diagnóstico. Esta variante es consecuencia de la mutación c.1213G>A, localizada en el exón 8 del gen *SQSTM1* que codifica el dominio UBA de la proteína p62.

La proteína p62 es considerada un puente entre el proceso de degradación proteica mediado por el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y el proceso de autofagia. En situaciones donde existe una inhibición del proteosoma, se produce una fosforilación de la serina en la posición S405 de la proteína p62, localizado en el dominio UBA, modulando su unión a las proteínas ubiquitinadas, que a su vez previenen la desfosforilación de la proteína p62 conduciendo a una degradación eficiente de agregados proteicos. Por lo tanto, alteraciones en el proteosoma favorece a un aumento de transcripción de la proteína p62, induciendo su síntesis³²⁹. Por consiguiente, la existencia de la variante p.G405S (Gly405Ser), caracterizada por un cambio de glicina por serina en el codón 405 de la proteína p62, podría ocasionar alteraciones conformacionales de la proteína dificultando la fosforilación de la misma en la posición

405, ocasionado alteración tanto en el proceso de degradación proteica mediante el sistema ubiquitina-proteosoma como en el proceso de autofagia, favoreciendo el desarrollo de la EOP³²⁹.

La variante genética p.G405S no ha sido identificada en la literatura previamente asociada a pacientes afectos de EOP ni a otra entidad relacionada con el gen del *SQSTM1*. La evidencia científica disponible actualmente es insuficiente para determinar el impacto de esta variante en la enfermedad, dado que únicamente disponemos de los resultados aportados por las herramientas bioinformáticas de predicción “*in silico*” donde la categorizan de deletérea, de la información procedente del estudio funcional y de la caracterización de ambas mutaciones adyacentes a la mutación p.G405S, así como del resultado del estudio de conservación aminoacídica inter-especie mostrando que el aminoácido G está conservado evolutivamente, por lo tanto todas estas informaciones pueden sugerir una posible repercusión de esta variable en la patogenia de la EOP. Sin embargo serían necesarios estudios funcionales y estudios en modelos animales para evidenciar el efecto deletéreo de esta variante en la desarrollo de la EOP. En nuestra población la mutación más frecuente identificada ha sido la p.P392L, descrita en el 74% de los pacientes afectos de mutaciones en el gen *SQSTM1* y en el 20% de la población afecta de EOP. La mutación p.P392L está localizada en el dominio UBA de la proteína p62 y tiene como consecuencia la pérdida de la capacidad de unión a las proteínas ubiquitinadas y a un aumento de la actividad NF-kB.

La activación de la ruta RANK-TRAF6-NF-kB es clave en la diferenciación, función y supervivencia de los osteoclastos^{180,181}. El dominio UBA juega un papel importante en la regulación negativa de la activación de esta ruta NF-kB. El dominio UBA mediante la ubiquitinización con residuos de Lys-63 es capaz de activar a la proteína CYLD y esta proteína activada, desubiquitina a la proteína TRAF6 y con ello frena la activación de la ruta NF-kB y por ende, inhibe la maduración y activación de los osteoclastos. En los pacientes portadores de mutaciones en el dominio UBA, como las mutaciones p.P392L, p.Q400X, p.M404V, p.G405S, la proteína p62 no es capaz de activar correctamente a la desubiquitinasa CYLD, por lo que no se produce la inhibición de la activación de la ruta NF-kB, provocando una hiperestimulación de la misma, lo que desemboca en el desacoplamiento en la osteoclastogénesis con un incremento de la actividad osteoclástica, favoreciendo el desarrollo de la EOP^{2,248,187}.

En relación a la correlación genotipo-fenotipo, nuestros resultados muestran que ser portador de la mutación p.P392L en el gen *SQSTM1*, se asocia de forma significativa a las variables que reflejan una mayor actividad de la enfermedad y mayor extensión al diagnóstico, como son: mayor número de lesiones óseas y mayor tendencia a la afectación polioestótica, con niveles más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como un mayor porcentaje de pacientes sintomáticos y una mayor edad al diagnóstico, mayor número de complicaciones siendo las artropatía por vecindad y la deformidad las más frecuentes, mostrando en todos los casos significación estadística respecto a la población con *SQSTM1* p.Pro392Leu negativo. En el análisis de asociación entre la presencia de historia familiar positiva y la población portadora de la mutación *SQSTM1* p.Pro392Leu, no se objetivó diferencias significativas, pero sí una tendencia de mayor porcentaje de antecedentes familiares en los pacientes portadores de la mutación en el gen *SQSTM1* p.Pro392Leu del 15% respecto al 8.1% de los pacientes *SQSTM1* p.Pro392Leu negativo. Estos datos son superponibles a la población portadora de las distintas mutaciones identificadas en el gen *SQSTM1* respecto a la población *SQSTM1* negativo. Por consiguiente, nuestros resultados confirman que los pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1* presentan un fenotipo más severo al diagnóstico en función de la extensión y actividad de la enfermedad, como se describe en otras series^{257,261}. Pero a diferencia de las series publicadas^{257,261}, la edad al diagnóstico en nuestros pacientes es mayor mostrando significación estadística respecto a la población *SQSTM1* negativo, así como no hemos descrito diferencias significativas en función de la presencia de una historia familiar positiva en relación a ser portador de mutaciones en el gen *SQSTM1*.

De acuerdo con las características clínico-demográficas de los pacientes portadores de las distintas mutaciones en el gen *SQSTM1*, en función del tipo de mutación “*missense*” o “*nonsense*” asociada, se ha observado un fenotipo más grave en función de la extensión y actividad de la enfermedad con mayor número de localizaciones óseas y niveles más elevados de múltiplos de FA al diagnóstico, así como la presencia de sintomatología y una edad más temprana en el momento del diagnóstico, asociado a los pacientes portadores de las mutaciones “*nonsense*” respecto a los pacientes portadores de mutaciones “*missense*”. Por consiguiente, el fenotipo tiende a ser más grave en pacientes portadores de mutaciones en el gen *SQSTM1* que ocasionan una proteína truncada que aquellas mutaciones “*missense*”, dado que producen una

disfunción más importante en la proteína p62, siendo superponible a lo descrito en la literatura^{257,247}.

A pesar que la mayoría de las mutaciones se agrupan dentro del dominio UBA de la proteína p62, hecho que conlleva la desregulación de la ruta de señalización RANK-TRAF6-NFKB, también se han identificado varias mutaciones externas al dominio UBA, como son las cuatro mutaciones “*missense*” siguientes descritas en la literatura: p.D335E, p.S349T, p.P364S, p.A381V^{142,255,256,257,265}. Por lo tanto el desarrollo de la enfermedad podría originarse de alteraciones en diferentes dominios o vías de señalización, dado la complejidad estructural y funcional así como la ubicuidad de esta proteína.

En cuanto a las mutaciones localizadas externas al dominio UBA en nuestra serie, se han descrito seis mutaciones “*missense*” (p.R161W, p.H163Y, p.K238E, p.G262R, p.E274D p.R321C) y una mutación “*nonsense*” como es la mutación p.Y383X. También se han identificado seis mutaciones sinónimas (p.H261H, p.S272S, p.D292D, p.R312R, p.S318S, p.P348P), con un impacto leve en la proteína, dado que el cambio de nucleótido no condiciona un cambio de aminoácido, permaneciendo el original sin comportar disfunción proteica. Sin embargo, las mutaciones “*missense*” y las “*nonsense*”, van a ocasionar un impacto moderado y severo en la proteína p62, respectivamente. En relación al análisis funcional de las diferentes variantes “*missense*” y “*nonsense*” “*in silico*” mediante los softwares bioinformáticos de predicción como SIFT, Polyphen-2 y pMUT, han podido categorizar a las variante genéticas como “seguramente perjudiciales” por Polyphen y “deletéreas” por SIFT, excepto las mutaciones p.E274D y p.R321C que las clasifican como mutaciones “neutrales” por las tres herramientas bioinformáticas.

En relación a la localización de las diferentes mutaciones externas al dominio UBA, se detallan a continuación. La mutación “*nonsense*” p.Y383X se localiza en el exón 7 cerca del dominio UBA. Las mutaciones p.E274D y p.R321C están localizadas en la parte del exón 6 del gen *SQSMT1*, que codifica el dominio PEST1 y en el dominio LIR de la proteína p62, respectivamente. La mutación p.G262R está localizada también en el exón 6 del gen *SQSMT1* y se localiza cerca del dominio PEST1 en la proteína p62. En el exón 5 del gen *SQSMT1* se encuentra la mutación p.K238E, que codifica el dominio TBS (TRAF6 binding sequence) de la proteína p62. Asimismo, las mutaciones p.R161W,

p.H163Y se encuentran localizadas en la parte del exón 3 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio ZZ de la proteína p62, en ambos casos.

La proteína p62, es una proteína adaptadora multidominio intracelular, reguladora de distintos complejos multiprotéicos en respuesta a diversos estímulos. La proteína p62 tiene un papel fundamental en gran variedad de funciones celulares, interviniendo en procesos complejos de señalización celular como la supervivencia celular, apoptosis, marcaje de proteínas y degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma y mediante la formación del autofagosoma en la autofagia, así como en la regulación de procesos de estrés oxidativo mediante las vías de señalización Keap1/Nrf2^{180,182,185}. A pesar de los diferentes procesos celulares donde se encuentra involucrada esta proteína, la mayor parte de la atención se ha centrado en aquellos que afectan a la diferenciación, actividad y supervivencia de los osteoclastos en relación a su papel en la regulación de la vía de señalización RANK-TRAF6-NFκB¹⁸⁴.

Por consiguiente la presencia de mutaciones en sus diferentes dominios estructurales podría ocasionar disfunciones en los distintos procesos de señalización celular necesarios para su interacción con la maquinaria autofágica y con las vías de señalización implicadas en la respuesta antioxidante, en la apoptosis, en la degradación proteica mediada por sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y en la regulación de la vía de señalización RANK-TRAF6-NFκB clave en la osteoclastogénesis, facilitando el desarrollo de diferentes patologías como enfermedades neurodegenerativas, cardiometabólicas, procesos inflamatorios y neoplásicos. No obstante a día de hoy, la entidad principalmente asociada a la proteína p62 es la EOP^{138,184}.

En nuestra serie, hemos identificado siete nuevas variantes genéticas, previamente no asociadas a la EOP, a pesar que una de ellas ha sido recientemente vinculada a la EOP en una población española. A continuación detallamos las distintas variantes genéticas distribuidas entre los diferentes dominios estructurales de la proteína p62, en función de su localización:

- En el exón 3 del gen *SQSMT1* se han identificado 2 mutaciones: p. R161W (p.Arg161Trp) y p.H163Y (His163Tyr), que codifican el dominio ZZ, formado por 35 aminoácidos (aa. 128-163), que interactúa con RIP1 (Proteína 1 que interactúa con el receptor) con el fin de regular la activación de NF-κB a través de la formación de complejos. Ambas mutaciones se describen en heterocigosis, en dos pacientes varones sin presencia de una historia familiar positiva con diferencias en función de las

características clínico-demográficas en relación a la clínica al diagnóstico, número de localizaciones, múltiplos de FA y edad al diagnóstico, mostrando un fenotipo más severo en la variante genética p.R161W, a pesar que la edad al diagnóstico era menor en la variante genética p.H163Y.

La variante R161W (Arg161Trp) es consecuencia de la mutación c.659C>T localizada en el exón 3 del gen *SQSMT1*, se caracteriza por un cambio de secuencia aminoacídica, reemplaza la arginina por triptófano en el codón 161 de la proteína p62. Los resultados del estudio "*in silico*" de predicción del efecto de esta variante en la estructura y función de la proteína p62, mediante los tres programas bioinformáticos utilizados (SIFT, Polyphen-2, pMUT), la categorizan como "Deletérea" en SIFT, "Posiblemente perjudicial" en PolyPhen-2 y "neutral" en pMUT. En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido R se encuentra semiconservado en las diferentes especies.

La variante p.H163Y (His163Tyr) se describe en heterocigosis compuesta asociada a la mutación p.P392L (Pro392Leu). Esta variante es consecuencia de la mutación c.665 C>T, localizada en el exón 3 del gen *SQSMT1* y se caracteriza por un cambio de histidina por tirosina en el codón 163 de la proteína p62. Los algoritmos de predicción "*in silico*" mediante las herramientas bioinformáticas como SIFT y Polyphen-2, clasifican a la variante como "Deletérea" en SIFT y "Seguramente perjudicial" en PolyPhen-2. En cambio, a diferencia de la variante R161W (Arg161Trp), en el estudio de conservación aminoacídica inter-especie se identificó que el aminoácido H de la variante p.H163Y está altamente conservado evolutivamente, mostrando una mayor implicación en la estructura y función proteica, esto es debido a que en las regiones más conservadas filogenéticamente se encuentran los centros activos enzimáticos y las regiones de acoplamiento de los receptores proteicos.

La EOP se caracteriza por un aumento de la osteoclastogénesis debido a una desregulación de la ruta NF- κ B². La proteína p62 se caracteriza por presentar un efecto dual en la ruta NF- κ B, a través de su dominio PB1, dominio ZZ y dominio TBS, promueve la activación de la ruta NF- κ B y a través de sus dominios PEST y UBA promueve el freno de la activación de la ruta NF- κ B¹⁸¹. Probablemente, la presencia de estas variantes en el dominio ZZ, una de ellas altamente conservada evolutivamente (p.H163Y) podrían afectar a la conformación estructural del dominio y con ello alterar su interacción con RIP y por ende la unión a la quinasa aPKC, induciendo una

desregulación de la ruta NF-κB que se traduciría en un aumento de la osteoclastogénesis y en el desarrollo de la EOP.

Estas variantes no se han descrito previamente en la literatura en individuos afectados de EOP ni en otra patología asociada al gen del *SQSMT1*. Por consiguiente, la evidencia disponible actualmente es insuficiente para determinar el papel de estas variantes en la enfermedad. No obstante serían necesarios estudios funcionales y estudios en modelos animales para evidenciar el efecto deletéreo de esta variante en la EOP.

- En el exón 5 del gen *SQSMT1* se encuentra la variante genética “*missense*” p.K238E (p.Lys238Glu). Nuestro estudio es el primero que describe la asociación de esta variante con la EOP, previamente había sido asociada en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica y demencia frontotemporal^{146,268,269,270}. La variante “*missense*” p.K238E se ha identificado en dos pacientes afectados de EOP en heterocigosis, en ambos casos eran de carácter esporádico. Uno de los pacientes era portador de la mutación p.E274D asociada. En ambos casos, se descartó patología neurodegenerativa asociada al diagnóstico y durante el periodo del estudio. La variante p.K238E (p.Lys238Glu) es consecuencia de la mutación c.890 A>G, localizada en el exón 5 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio TBS (TRAF6 binding sequence) de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de lisina por ácido glutámico en el codón 238 de la proteína p62. Los resultados de los estudios “*in silico*” para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 se realizó mediante las herramientas bioinformáticas: SIFT, Polyphen-2 y pMUT, clasificando a la variante como “Deletérea” en SIFT, “Posiblemente perjudicial” en PolyPhen-2 y “neutral” en pMUT. En cuanto al estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido K está conservado evolutivamente. El análisis de correlación fenotipo-genotipo, mostró que los pacientes portadores de la variante p.K238E presentaban una mayor extensión de la enfermedad en función de un mayor número de localizaciones al diagnóstico respecto a la población *SQSMT1* negativo.

La variante “*missense*” p.K238E, se encuentra en el dominio TBS de la proteína p62, sitio de unión al receptor asociado al factor de necrosis tumoral (TRAF6, TNF Receptor Associated Factor 6), lugar donde la proteína p62 interactúa con TRAF6, componente esencial en la activación de la ruta RANK-TRAF6-NF-κB, por lo tanto esta sustitución de una lisina por ácido glutámico en el codón 238 (p. Lys238Glu) provocaría

alteraciones en la proteína p62 causando un desacoplamiento de esta vía de señalización traduciéndose en un incremento de la osteoclastogénesis, base patogénica del desarrollo de la EOP¹³⁸. Por consiguiente, y a pesar de la insuficiente evidencia científica disponible acerca de esta variante en la actualidad, pero dado la información aportada tanto por las herramientas bioinformáticas de predicción como el impacto de esta variante en otras entidades clínicas^{146,268,269,270} así como por su localización en un dominio que juega un papel estratégico en la fisiopatología de la EOP, esta mutación podría presentar un impacto importante en el desarrollo de la EOP.

- En el exón 6 del gen *SQSMT1* se identifican las siguientes variantes “*missense*”, p.G262R (Gly262Arg), p.E274D (Glu274Asp), R321C (Arg321Cys), localizadas en diferentes dominio de la proteína p62, las características de dichas variantes, se detallan a continuación:

1. La variante genética “*missense*” p.G262R (Gly262Arg) se describe en heterocigosis en un caso de carácter esporádico. Esta variante es consecuencia de la mutación c.962 G>A, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1*, que codifica una región cerca del dominio PEST1 de la proteína p62 y se caracteriza por un cambio de arginina por triptófano en el codón 262 de la proteína p62. Los algoritmos de predicción “*in silico*” analizados mediante los tres programas bioinformáticos como SIFT, Polyphen-2 y pMUT han clasificado a la variante como “Deletérea” en SIFT, “Posiblemente perjudicial” en PolyPhen-2 y “neutral” en pMUT. En relación con el estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido G está conservado evolutivamente. La variante “*missense*” p.G262R (Gly262Arg) no ha sido identificada en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectados de EOP, sin embargo se ha descrito en pacientes afectados de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica¹⁵⁹. En el paciente afecto de EOP portador de la variante p.G262R, se descartó patología neurodegenerativa asociada al diagnóstico y durante el periodo del estudio. A pesar de la insuficiente evidencia científica disponible acerca de esta variante en la actualidad, pero dado la información aportada, procedente del efecto de esta mutación en otra patología como es la esclerosis lateral amiotrófica¹⁵⁹, los resultados de las herramientas bioinformáticas de predicción y por su localización cerca del dominio PEST1 de la proteína p62, así como la presencia del aminoácido G altamente conservado en el estudio filogenético, podría sugerir una repercusión en la fisiopatología de la EOP de esta mutación, no obstante serian necesarios estudios

funcionales para evaluar el efecto de dicha variante en la estructura y función de la proteína p62.

2. La variante genética “*missense*” p.E274D (Glu274Asp) se describe en heterocigosis en cinco pacientes varones con historia familiar positiva. Dos pacientes eran portadores de mutaciones complejas en el gen *SQSMT1*, un paciente era portador de la variante p.E274D asociado a la variante p.P392L, otro paciente era portador de la variante p.K238E asociado a la variante p.E274D, y el resto de pacientes únicamente eran portadores de la variante p.E274D, sin presentar diferencias significativas entre ellos. En el estudio de correlación genotipo-fenotipo, el ser portador de la variante “*missense*” p.E274D se asociaba a una mayor extensión de la enfermedad en función de un mayor número de localizaciones al diagnóstico respecto a la población *SQSMT1* negativo, así como la presencia de una historia familiar positiva, mostrando significación estadística en ambas variables. Esta variante p.E274D es consecuencia de la mutación c.1000 G>C, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1* y se caracteriza por un cambio de ácido glutámico por ácido aspártico en el codón 274 de la proteína p62. Los resultados de los algoritmos desarrollados “*in silico*” para predecir el efecto potencial de esta variante en la estructura y función de la proteína p62 analizado mediante las herramientas bioinformáticas (SIFT, Polyphen-2 y pMUT), categorizan a la variante como “neutral”. El estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido E está semiconservado evolutivamente. La variante genética p.E274D no ha sido descrita en la literatura científica previamente asociada a pacientes afectados de EOP, sin embargo se ha descrito en pacientes afectados de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal^{269,270,293}. Durante el estudio, se descartó patología neurodegenerativa asociada en los pacientes portadores de la variante p.E274D al diagnóstico y durante el periodo del estudio.

En el estudio de Rubino E y col, la variante p.E274D se identificó en 5 pacientes con demencia frontotemporal (2.9%), en 11 pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (8.9%) y en 4 controles (2.8%), con una MAF del 2.38%²⁶⁹. Asimismo, en el estudio van der Zee J y col²⁷⁰, la variante p.E274D se describió en 109 pacientes afectados de demencia frontotemporal (6.02%), en 22 pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (5.57%) y 79 controles (2.02%) con una MAF >1 %, considerándola más como un polimorfismo que como una mutación, dado que aparece en un porcentaje mayor al 1%

en la población control. En cambio en nuestro estudio la variante p.E274D no se identificó en la población control.

La variante “*missense*” p.E274D se encuentra localizada en la parte del exón 6 del gen del *SQSMT1* que codifica el dominio PEST1 de la proteína p62. En la proteína p62 existen 2 secuencias PEST (regiones de los aminoácidos 266 a 294 y 345 a 377)¹⁷⁵. El dominio PEST es una secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T). Esta secuencia actúa como un péptido señal, con función proteolítica facilitando una rápida degradación de las proteínas de vida de media corta, así como se caracteriza por ser un dominio diana de las caspasas, vinculado al proceso de apoptosis^{138,329}. Asimismo, la proteína p62 a través de sus dominios PEST promueve el freno de la activación de la ruta NF-κB¹⁸¹. Probablemente, la presencia de esta variante en el dominio PEST1, podría afectar a la conformación estructural del dominio, induciendo una desregulación de la ruta NF-κB, así como una alteración en el proceso de apoptosis³²⁹ que se traduciría en un aumento de la osteoclastogénesis favoreciendo el desarrollo de la EOP.

3. La variante “*missense*” p.R321C (Arg321Cys) se describe en heterocigosis asociado a la mutación p.P392L en un paciente varón de carácter esporádico. Esta variante es consecuencia de la mutación c.961C>T, localizada en el exón 6 del gen *SQSMT1* que codifica el dominio LIR de la proteína p62. Esta mutación se caracteriza por un cambio de arginina por cisteína en el codón 321 de la proteína p62. Los resultados de los algoritmos de predicción “*in silico*” analizados mediante los tres programas bioinformáticos como SIFT, Polyphen-2 y pMUT han clasificado a la variante como “Deletérea” en SIFT, “Seguramente perjudicial” en PolyPhen-2 y “neutral” en pMUT. El estudio de conservación aminoacídica inter-especie nos mostró que el aminoácido R no se encuentra conservado evolutivamente, únicamente se encuentra presente en humanos y en *Pan troglodytes* (*Chimpanzee*), siendo el aminoácido Q el presente en la gran mayoría de las especies detalladas, sin evidenciarse en el estudio filogenético la presencia del aminoácido C.

En el estudio de Rea y col.²⁶⁸, se describió la variante genética p.R321C, en un paciente (1/765) con fenotipo de esclerosis lateral amiotrófica y en 5 individuos sanos (5/5693). Asimismo en el estudio de Van der Zee J. y col.²⁷⁰, se observó la mutación p.R321C, en 3 pacientes afectados de demencia frontotemporal (3/1808), en un paciente con esclerosis lateral amiotrófica (1/395) y en 1 individuo control (1/3899). Sin embargo,

en ambos estudios no descartaron la presencia de la enfermedad ósea de Paget en la población control y los portadores de la mutación fueron <1%, por lo que no se considera un polimorfismo poblacional. Por contra en nuestro estudio se descartó la presencia de dicha mutación en la población control. Estas evidencias junto con los resultados del análisis de predicción “*in silico*” de esta mutación, podrían sugerir que ser portador del alelo C en la localización 321 de la proteína p62, podría tener un posible efecto funcional a nivel proteico.

Recientemente, la mutación p.R321C ha sido descrita asociada a EOP, en una cohorte española¹¹¹, siendo la primera descripción de esta variante asociada a esta entidad. Sin embargo, esta variante ha sido identificada previamente en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica esporádica²⁷¹ y en pacientes con demencia frontotemporal^{268,269,270,271,273}. Probablemente, la asociación observada entre el gen *SQSTM1* y la mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal, podría estar relacionada con el papel que desempeña la proteína p62 en la degradación proteica mediante el sistema ubiquinina-proteosoma y en el proceso de autofagia²⁷⁰. Se ha constatado que la desregulación del proceso de autofagia está implicada en el desarrollo de enfermedades tales como enfermedades infecciosas, procesos neoplásicos y las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington), habiéndose encontrado inclusiones citoplasmáticas que podrían corresponder con agregados proteicos de p62 que se acumulan como resultado de un proceso deficiente de autofagia^{175,215,216}. Sin embargo, el paciente portador de la variante genética p.R321C en nuestro estudio, no presentó ninguna manifestación clínica secundaria a patología neurodegenerativa ni al diagnóstico ni durante el periodo de estudio, sugiriendo que la presencia de la mutación del gen *SQSTM1* podría estar asociada también a un segundo impacto genético o ambiental en relación con las enfermedades neurodegenerativas.

Esta variante p.R321C se localiza en la parte del exón 6 del gen *SQSTM1* que codifica al dominio LIR de la proteína p62, región de unión al responsable de la regulación de la autofagia, la proteína LC3. La interacción entre el dominio LIR y la proteína LC3 es clave para el aclaramiento de proteínas ubiquitinadas o agregados proteicos de vida media larga, mediante el anclaje de proteínas a la membrana del autofagosoma a través de la proteína LC3. Posteriormente, tanto la proteína p62 como la proteína LC3

serán eliminadas en el proceso de autofagia junto con el resto de proteínas previamente marcadas con ubiquitina²¹²⁻²¹³.

Los resultados procedentes del estudio funcional realizado por Usategui-Martín R y col, describen a 3 pacientes afectados de EOP portadores de la mutación p.R321C sin presencia de enfermedad neurodegenerativa asociada¹¹¹, mostrando niveles más altos de expresión de las proteínas p62 y LC3B en la células portadoras de la mutación, correlacionándose con niveles más bajos de autofagia en dichas células, sugiriendo un bloqueo del proceso de autofagia por parte de esta variante p.R321C. Probablemente el origen de este bloqueo en el proceso de autofagia derive de la falta de interacción entre las proteínas p62 y LC3. Asimismo describen que las células portadoras de la variante p.R321C, en las que se produce un bloqueo de la autofagia, mostraban una mayor tasa de división celular, con un crecimiento celular más rápido y más viables que las células control. Probablemente, la acumulación de la proteína p62 por un bloqueo de la autofagia podría causar una mayor activación de la vía NF-κB y por ende un aumento en la proliferación celular en las células portadoras de la mutación. Estas observaciones apoyarían la hipótesis de que las alteraciones en el proceso de autofagia podrían estar involucradas en el desarrollo del EOP. La proteína p62 juega un papel importante en la cascada de señalización celular relacionada con la osteoclastogénesis a través del NF-κB, así como en la apoptosis y en el proceso de autofagia¹⁵⁹. Los osteoclastos pagéticos muestran estructuras citoplásmicas que se han propuesto que podrían ser agregados proteicos resultantes de alteraciones en el proceso de autofagia^{120,178,261,285}. Por lo tanto, los acúmulos de la proteína p62 consecuencia de un proceso de autofagia deficiente, causarían una mayor activación de la vía NF-κB y por ende un aumento en la proliferación celular, es decir una mayor proliferación osteoclástica, característico de la fisiopatología de la EOP²⁵⁵. En el estudio funcional¹¹¹ se confirma la idea que ser portador del alelo C de la mutación p.R321C podría inducir un bloqueo en la autofagia y podría activar la proliferación celular a través de la ruta NF-κB. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la participación del proceso de autofagia en la enfermedad ósea de Paget.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- ❖ Nuestros hallazgos sugieren que en los dos últimos periodos del estudio (1994-2009) existe un declive progresivo en el porcentaje de nuevos diagnósticos en relación a la población de referencia, siendo esta cohorte emplazada en un área urbana de baja prevalencia y caracterizada por presentar un extenso periodo de seguimiento. En cuanto a la distribución por género, se ha observado un comportamiento superponible a las tendencias evidenciadas en la población global de EOP.
- ❖ En nuestra serie se ha constatado una disminución en la actividad biológica de la enfermedad, una menor extensión de la enfermedad y una mayor edad de presentación en el momento del diagnóstico, en función del año de nacimiento y año del diagnóstico. Asimismo, se ha objetivado una mayor severidad en el momento del diagnóstico en los pacientes con edades al diagnóstico de <45 años y ≥75 años. En relación al género, se han observado diferencias significativas en cuanto a los marcadores de severidad al diagnóstico en ambos grupos. Sin embargo, se ha detectado un fenotipo diferencial al diagnóstico en función del género, mostrando una mayor tendencia de afectación monostótica, menor extensión y actividad de la enfermedad, así como una mayor edad al diagnóstico en el sexo femenino.
- ❖ Se han identificado cinco factores independientes de mal pronóstico, como el índice anatómico de Renier, número de localizaciones, múltiplos de FA, edad al diagnóstico y el género femenino, que van a favorecer la aparición de peores desenlaces, como la presencia de mayores complicaciones durante el curso de la enfermedad. Por consiguiente, el análisis de estos factores al diagnóstico va a permitir evaluar el posible riesgo de complicaciones que pueden acontecer durante el curso de la enfermedad, permitiendo una mejora en la estrategia clínico-terapéutica.
- ❖ En nuestro estudio se observa que ser portador del alelo C del polimorfismo rs1805034 y del alelo A del polimorfismo rs3018362 del gen *TNFRSF11A* está asociado con un incremento de riesgo de desarrollar la enfermedad ósea de Paget, así como la presencia de un fenotipo más severo al diagnóstico en relación a los índices de extensión y actividad de la enfermedad. La presencia del alelo T en el

polimorfismo rs6567274 del gen *TNFRSF11A* se asoció con una disminución de riesgo a desarrollar la enfermedad ósea de Paget, así como a un fenotipo más leve con menores complicaciones durante el curso de la enfermedad. Asimismo, se observó que ser portador del alelo A del polimorfismo rs11573871 del gen *TNFRSF11B* se encontraba asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad ósea de Paget así como a la presencia de un fenotipo más leve al diagnóstico. Por consiguiente, variantes genéticas en el gen *TNFRSF11A* y en el gen *TNFRSF11B* se asocian a un incremento de riesgo a desarrollar la enfermedad ósea de Paget e incluso influyen en su fenotipo, siendo este impacto mayor cuando existen interacciones entre ellos, incluso cuando se combinan con el gen *SQSTM1*, reflejado en los estudios de epistasis. Estas evidencias sustentan la presencia de un componente poligénico en la fisiopatología de la enfermedad.

- ❖ En el estudio molecular del gen *SQSTM1* en nuestra cohorte de pacientes con enfermedad ósea de Paget identificamos diecisiete mutaciones en regiones codificantes del gen, siendo la más frecuentemente descrita la p.P392L, asociada a un fenotipo más severo en función de una mayor actividad de la enfermedad y mayor extensión al diagnóstico así como mayores complicaciones durante el curso de la misma, sin presencia de una historia familiar positiva asociada.
- ❖ En el estudio molecular del gen *SQSTM1* describimos la presencia de seis nuevas variantes genéticas “*missense*”, asociadas todas ellas a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de la EOP y distribuidas en los diferentes dominios estructurales y funcionales de la proteína p62, pudiendo ocasionar disfunciones en los distintos procesos de señalización celular donde interviene. Estos resultados nos muestran la diversidad de procesos como la apoptosis, la autofagia, la degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma, la regulación de la respuesta antioxidante y la supervivencia celular mediada por la vía de señalización RANK-TRAF6-NF- κ B, que se encuentran implicados en la fisiopatología de la enfermedad ósea de Paget.

8. LÍNEAS DE FUTURO

8. LÍNEAS DE FUTURO

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación enmarcado en dos escenarios muy distintos pero al mismo tiempo complementarios, como es el ámbito clínico y molecular, hemos contribuido a despejar algunas incógnitas sobre el tema tratado, y de forma simultánea se han generado nuevas preguntas, nuevas ideas, lo que ha favorecido la aparición de nuevas líneas de investigación como opción para futuros trabajos.

A continuación se presentan algunas líneas de investigación que pueden ser objeto de interés, atendiendo a los resultados de este trabajo de tesis o que, por exceder el alcance de la misma, no han podido ser tratados con la suficiente profundidad. Entre las posibles líneas futuras de investigación destacamos:

- ❖ El estudio clínico y epidemiológico, donde hemos analizados el comportamiento secular de la incidencia y severidad de la población de EOP en una área de baja prevalencia. Una de las razones que ha podido influir en este cambio de comportamiento en las últimas décadas, a parte de los flujos migratorios que han podido haber modificado la estructura poblacional, son los factores medioambientales, es decir, cambios en la exposición a uno o más agentes ambientales involucrados en la patogenia de la EOP. Lamentablemente, durante el desarrollo de nuestro estudio no recogimos datos sobre los contactos con animales, vacunas, dietas, sobrecargas mecánicas o exposición a tóxicos o a infecciones en nuestra población de estudio, no pudiendo evaluar el posible efecto de los factores ambientales en el patrón del comportamiento de la EOP en nuestra población. Por lo tanto, una de las líneas de investigación que proponemos, sería identificar y analizar estos factores ambientales en nuestra población de estudio.
- ❖ Una de las incógnitas que sigue existiendo en esta enfermedad, es el comportamiento focal de la lesiones óseas pagéticas con una distribución asimétrica y con aparición simultánea desde el diagnóstico. Durante años se ha planteado la hipótesis de la existencia de mutaciones somáticas como la variante p.P392L (*SQSMT1*) en las etapas tempranas del cigoto que podrían ser responsables del mosaicismo detectado en las lesiones pagéticas, pero estos resultados no fueron consistentes con los resultados de otros grupos de

investigación. Por lo tanto, a día de hoy, no podemos determinar si las mutaciones somáticas contribuyen a la naturaleza focal de esta enfermedad. Una de las líneas de investigación propuesta, sería determinar la existencia de mutaciones somáticas de otros genes relacionados con la osteoclastogénesis y por ende con la EOP, como son el gen *TNFRSF11A* y *TNFRSF11B* o incluso genes relacionados con el proceso de autofagia como *ATG16L1* y *ATG5*, en las lesiones pagéticas.

- ❖ A pesar de las múltiples investigaciones acerca de la etiopatogenia de la EOP llevadas a cabo durante décadas, sobretudo basadas en estudios moleculares de mutaciones en líneas germinales de estos pacientes, no han conseguido aportar un conocimiento completo de esta enfermedad compleja. A día de hoy se han identificado 29 mutaciones en el gen *SQSMT1* asociadas a la EOP, siendo este gen el que ha mostrado una mayor asociación con la EOP, debido a que juega un papel clave en la cascada de señales celulares relacionadas con la osteoclastogénesis a través de la vía NF- κ B. Paralelamente otros genes han sido identificados asociados a la EOP, de forma independiente, en base a estudios de ligamiento, estudios genéticos de asociación y estudios de genoma completo (GWAS), mostrando un incremento de riesgo de desarrollar EOP y un impacto en la variabilidad fenotípica al diagnóstico. A día de hoy, son escasos los estudios que se han realizado en base a interacciones funcionales entre estos genes candidatos, por lo tanto un la línea de investigación sería analizar el efecto de las interacciones de estos genes candidatos asociados a la EOP mediante estudios de epistasis genética, pudiendo acercarse más al conocimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad poligénica.
- ❖ En nuestro estudio hemos identificado nuevas variantes genéticas “*missense*” en el gen de *SQSMT1* asociadas a la EOP, distribuidas en los distintos dominios estructurales y funcionales de la proteína p62 con implicación en diferentes procesos celulares como en el sistema ubiquitina-proteosoma, en el proceso de autofagia y de apoptosis así como en la supervivencia celular. La mayor parte de las nuevas variantes descritas en nuestro estudio han sido categorizadas como patógenas mediante las herramientas bioinformáticas de predicción “*in silico*” y altamente conservadas en los estudios filogenéticos, con ubicaciones claves en los dominios estructurales de la proteína p62 y dada la escasa

evidencia científica disponible sobre el papel funcional de estas variantes en la EOP, se propone una nueva línea de investigación para determinar el efecto deletéreo de estas variantes genéticas en la EOP en base a la realización de estudios experimentales tanto estudios funcionales como estudios en modelos animales.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Staa TP, Selby P, Leufkens HG, Lyles K, Sprafka JM, Cooper C. Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):465–471.
2. Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 2012;91(2):97-113.
3. Paget J. On a Form of Chronic Inflammation of Bones (Osteitis Deformans). *Med Chir Trans.* 1877; 60:37-63.
4. Paget J. Additional Cases of Osteitis Deformans. *Med Chir Trans.* 1882;65:225-36.
5. Paget, J. Remarks on osteitis deformans. *The Illustrated Medical News 1889* ; 2: 181-2.
6. Corral-Gudino L, Borao-Cengotita-Bengoa M, Del Pino-Montes J, Ralston S. Epidemiology of Paget's disease of bone: a systematic review and meta-analysis of secular changes. *Bone.* 2013; 55(2):347-52.
7. Davie M, Davies M, Francis R, Fraser W, Hosking D, Tansley R. Paget's disease of bone: a review of 889 patients. *Bone.* 1999; 24(5 Suppl):11S-12S.
8. Cooper C, Dennison E, Schafheutle K, Kellingray S, Guyer P, Barker D. Epidemiology of Paget's disease of bone. *Bone.* 1999; 24(5 Suppl):3S-5S.
9. Holgado S, Rotés D, Gumà M, Monfort J, Olivé A, Carbonell J, et al. Paget's disease of bone in early adult life. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(2):306-8.
10. Barker DJ. The epidemiology of Paget's disease of bone. *Br Med Bull.* 1984; 40(4):396-400.
11. Guyer PB, Chamberlain AT. Paget's disease of bone in two American cities. *Br Med J.* 1980; 280(6219):985.
12. Altman RD, Bloch DA, Hochberg MC, Murphy WA. Prevalence of pelvic Paget's disease of bone in the United States. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(3):461-5.
13. Guyer PB, Chamberlain AT. Paget's disease of bone in South Africa. *Clin Radiol.* 1988; 39(1):51-2.
14. Barker DJ, Chamberlain AT, Guyer PB, Gardner MJ. Paget's disease of bone: the Lancashire focus. *Br Med J.* 1980; 280(6222):1105-7.
15. Barker DJ, Clough PW, Guyer PB, Gardner MJ. Paget's disease of bone in 14 British towns. *Br Med J.* 1977; 1(6070):1181-3.
16. Reasbeck JC, Goulding A, Campbell DR, Beale LR, Stewart RD. Radiological prevalence of Paget's disease in Dunedin, New Zealand. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983; 286(6382):1937.
17. Dahniya MH. Paget's disease of bone in Africans. *Br J Radiol.* 1987; 60(710):113-6.
18. Hashimoto J, Ohno I, Nakatsuka K, Yoshimura N, Takata S, Zamma M, et al; Japanese Committee on Clinical Guidelines of Diagnosis and Treatment of Paget's Disease of Bone of the Japan Osteoporosis Society. Prevalence and clinical features of Paget's disease of bone in Japan. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(3):186-90.
19. Ziegler R, Holz G, Rotzler B, Minne H. Paget's disease of bone in West Germany. Prevalence and distribution. *Clin Orthop Relat Res.* 1985; (194):199-204.
20. Detheridge FM, Guyer PB, Barker DJ. European distribution of Paget's disease of bone. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982; 285(6347):1005-8.

21. Gennari L, Di Stefano M, Merlotti D, Giordano N, Martini G, Tamone C, et al. Prevalence of Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res.* 2005 ;20(10):1845-50.
22. Guañabens N, Rotés D, Holgado S, Gobbo M, Descalzo MÁ, Gorordo JM, et al. Implications of a new radiological approach for the assessment of Paget disease. *Calcif Tissue Int.* 2012; 91(6):409-15.
23. Guañabens N, Garrido J, Gobbo M, Piga AM, del Pino J, Torrijos A, et al; PAGET Study Group. Prevalence of Paget's disease of bone in Spain. *Bone.* 2008; 43(6):1006-9.
24. Britton C, Brown S, Ward L, Rea SL, Ratajczak T, Walsh JP. The Changing Presentation of Paget's Disease of Bone in Australia, A High Prevalence Region. *Calcif Tissue Int.* 2017; 101(6):564-9.
25. Mirón-Canelo JA, Del Pino-Montes J, Vicente-Arroyo M, Sáenz-González MC. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). The Paget's disease of the bone study group of Salamanca. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13(7):801-5.
26. Rendina D, Gennari L, De Filippo G, Merlotti D, de Campora E, Fazioli F, et al. Evidence for increased clinical severity of familial and sporadic Paget's disease of bone in Campania, southern Italy. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(12):1828-35.
27. Gennari L, Merlotti D, Martini G, Nuti R. Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res.* 2006; 21 Suppl 2:P14-21.
28. Tiegs RD, Lohse CM, Wollan PC, Melton LJ. Long-term trends in the incidence of Paget's disease of bone. *Bone.* 2000; 27(3):423-7.
29. Cundy HR, Gamble G, Wattie D, Rutland M, Cundy T. Paget's disease of bone in New Zealand: continued decline in disease severity. *Calcif Tissue Int.* 2004; 75(5):358-64.
30. Poór G, Donáth J, Fornet B, Cooper C. Epidemiology of Paget's disease in Europe: the prevalence is decreasing. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(10):1545-9.
31. Corral-Gudino L, García-Aparicio J, Sánchez-González MD, Mirón-Canelo JA, Blanco JF, Ralston SH, et al. Secular changes in Paget's disease: contrasting changes in the number of new referrals and in disease severity in two neighboring regions of Spain. *Osteoporos Int.* 2013; 24(2):443-50.
32. Bastin S, Bird H, Gamble G, Cundy T. Paget's disease of bone--becoming a rarity? *Rheumatology (Oxford).* 2009; 48(10):1232-5.
33. Reis RL, Poncell MF, Diniz ET, Bandeira F. Epidemiology of Paget's disease of bone in the city of Recife, Brazil. *Rheumatol Int.* 2012; 32(10):3087-91.
34. Kanis JA. Pathophysiology and treatment of Paget's disease of bone. London: Martin Dunitz; 1998.
35. Morales-Piga AA, Bachiller-Corral FJ, Abaira V, Beltrán J, Rapado A. Is clinical expressiveness of Paget's disease of bone decreasing? *Bone.* 2002; 30(2):399-403.
36. Merlotti D, Gennari L, Galli B, Martini G, Calabrò A, De Paola V, et al. Characteristics and familial aggregation of Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(8):1356-64.
37. Seton M, Choi HK, Hansen MF, Sebaldt RJ, Cooper C. Analysis of environmental factors in familial versus sporadic Paget's disease of bone--the New England Registry for Paget's Disease of Bone. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(8):1519-24.
38. Mangham DC, Davie MW, Grimer RJ. Sarcoma arising in Paget's disease of bone: declining incidence and increasing age at presentation. *Bone.* 2009; 44(3):431-6.

39. Tan A, Ralston SH. Clinical presentation of Paget's disease: evaluation of a contemporary cohort and systematic review. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95(5):385-92.
40. Gumà M, Rotés D, Holgado S, Monfort J, Olivé A, Carbonell J, et al. Enfermedad ósea de Paget: estudio de 314 pacientes [Paget's disease of bone: study of 314 patients]. *Med Clin (Barc).* 2002; 119(14):537-40.
41. Bolland MJ, Cundy T. Paget's disease of bone: clinical review and update. *J Clin Pathol.* 2013; 66(11):924-7.
42. Cundy T. Paget's disease of bone. *Metabolism.* 2018; 80:5-14.
43. Altman RD. Musculoskeletal manifestations of Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum.* 1980; 23(10):1121-7.
44. Bone HG. Nonmalignant complications of Paget's disease. *J Bone Miner Res.* 2006; 21 Suppl 2:P64-8.
45. Wermers RA, Tiegs RD, Atkinson EJ, Achenbach SJ, Melton LJ 3rd. Morbidity and mortality associated with Paget's disease of bone: a population-based study. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(6):819-25.
46. Rendina D, De Filippo G, Ralston SH, Merlotti D, Gianfrancesco F, Esposito Tet al. Clinical characteristics and evolution of giant cell tumor occurring in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(2):257-63.
47. Michou L, Orcel P. The changing countenance of Paget's Disease of bone. *Joint Bone Spine.* 2016; 83(6):650-655.
48. Monsell EM, Bone HG, Cody DD, Jacobson GP, Newman CW, Patel SC, et al. Hearing loss in Paget's disease of bone: evidence of auditory nerve integrity. *Am J Otol.* 1995; 16(1):27-33.
49. Hansen MF, Seton M, Merchant A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2006; 21 Suppl 2:P58-63.
50. Hadjipavlou A, Lander P, Srolovitz H, Enker IP. Malignant transformation in Paget disease of bone. *Cancer.* 1992; 70(12):2802-8.
51. Coutris G, Cayla J, Rondier J, Talbot JN, Bonvarlet JP, Milhaud G. Analyse des perturbations des voies principales du métabolisme calcique dans la maladie de Paget. Effets de l'administration de calcitonine a propos de 26 observations [Analysis of disorders of the principal pathways of calcium metabolism in Paget's disease. Effects of calcitonin administration. 26 cases]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1975; 42(12):759-67..
52. Reiner JC, Bontoux-Carre E, Seret P, Villayleck S. Comment évaluer, en pratique, l'activité de la maladie de Paget et quels malades traiter? [How to evaluate the activity of Paget's disease in clinical practice and which patients should be treated?]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1984; 51(9):463-8.
53. Al Nofal AA, Altayar O, BenKhadra K, Qasim Agha OQ, Asi N, Nabhan M, et al. Bone turnover markers in Paget's disease of the bone: A Systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2015; 26(7):1875-91.
54. Davis MA, Scalcione LR, Gimber LH, Thompson RB, Avery RJ, Taljanovic MS. Paget sarcoma of the pelvic bone with widespread metastatic disease on radiography, CT, MRI, and 18F-FDG PET/CT with pathologic correlation. *Clin Nucl Med.* 2014; 39(4):371-3.
55. Selby PL, Davie MW, Ralston SH, Stone MD; Bone and Tooth Society of Great Britain; National Association for the Relief of Paget's Disease. Guidelines on the management of Paget's disease of bone. *Bone.* 2002; 31(3):366-73.

56. Rotés-Sala D, Monfort J, Solano A, Miralles E, Vila J, Carbonell J. The clover and heart signs in vertebral scintigraphic images are highly specific of Paget's disease of bone. *Bone*. 2004; 34(4):605-8.
57. Seitz S, Priemel M, Zustin J, Beil FT, Semler J, Minne H, et al. Paget's disease of bone: histologic analysis of 754 patients. *J Bone Miner Res*. 2009; 24(1):62-9.
58. Alonso N, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J. Clinical and Genetic Advances in Paget's Disease of Bone: a Review. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2017;15(1):37-48.
59. Ralston SH, Corral-Gudino L, Cooper C, Francis RM, Fraser WD, Gennari L, et al. Diagnosis and Management of Paget's Disease of Bone in Adults: A Clinical Guideline. *J Bone Miner Res*. 2019; 34(4):579-604.
60. Devogelaer JP, Bergmann P, Body JJ, Boutsen Y, Goemaere S, Kaufman JM, et al; Belgian Bone Club. Management of patients with Paget's disease: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*. 2008; 19(8):1109-17.
61. Lyles KW, Siris ES, Singer FR, Meunier PJ. A clinical approach to diagnosis and management of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2001; 16(8):1379-87.
62. Siris ES, Lyles KW, Singer FR, Meunier PJ. Medical management of Paget's disease of bone: indications for treatment and review of current therapies. *J Bone Miner Res*. 2006; 21 Suppl 2:P94-8.
63. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan GS, Selby PL, Ralston SH; PRISM Trial Group. Randomized trial of intensive bisphosphonate treatment versus symptomatic management in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(1):20-31.
64. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006; 38(5):617-27.
65. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296(2):235-42.
66. Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. *N Engl J Med*. 2005; 353:898-908.
67. Schwarz P, Rasmussen AQ, Kvist TM, Andersen UB, Jørgensen NR. Paget's disease of the bone after treatment with Denosumab: a case report. *Bone*. 2012 May;50(5):1023-5. Schwarz P, Rasmussen AQ, Kvist TM, Andersen UB, Jørgensen NR. Paget's disease of the bone after treatment with Denosumab: a case report *Bone*. 2012; 50(5):1023-5.
68. Parvizi J, Klein GR, Sim FH. Surgical management of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2006 Dec;21 Suppl 2:P75-82.
69. Vallet M, Ralston SH. Biology and Treatment of Paget's Disease of Bone. *J Cell Biochem*. 2016; 117(2):289-99.
70. Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. *Lancet*. 2008; 372(9633):155-63.
71. Reid IR, Lyles K, Su G, Brown JP, Walsh JP, Del Pino-Montes J, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years. *J Bone Miner Res* 2011 Sep;26(9):2261-70
72. Altman RD, Johnston CC, Khairi MR, Wellman H, Serafini AN, Sankey RR. Influence of disodium etidronate on clinical and laboratory manifestations of Paget's disease of bone (osteitis deformans). *N Engl J Med*. 1973; 289(26):1379-84.

73. Khairi MR, Altman RD, DeRosa GP, Zimmermann J, Schenk RK, Johnston CC. Sodium etidronate in the treatment of Paget's disease of bone. A study of long-term results. *Ann Intern Med.* 1977; 87(6):656-63.
74. Bijvoet OL, van der Sluys Veer J, Jansen AP. Effects of calcitonin on patients with Paget's disease, thyrotoxicosis, or hypercalcaemia. *Lancet.* 1968; 1(7548):876-81.
75. Reid IR. *Advances in pathobiology and management of Paget's disease of bone.* London: Academic Press; 2016.
76. Wallace E, Wong J, Reid IR. Pamidronate treatment of the neurologic sequelae of pagetic spinal stenosis. *Arch Intern Med.* 1995; 155(16):1813-5.
77. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092:385-96.
78. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008; 22(5):701-22.
79. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11(4):219-27.
80. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012; 45(12):863-73.
81. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423(6937):337-42.
82. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 1987 Sep;219(1):1-9.
83. Seeman E, Martin TJ. Co-administration of antiresorptive and anabolic agents: a missed opportunity. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(5):753-64.
84. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014; 3:481.
85. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med.* 2014; 20(8):449-59.
86. Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone.* 2000; 26(4):319-23.
87. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep.* 2012; 1:183.
88. Tilg H, Moschen AR, Kaser A, Pines A, Dotan I. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut.* 2008; 57(5):684-94.
89. Teti A. Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *Bonekey Rep.* 2013; 2:449.
90. Solomon LR. Billiard-player's fingers: an unusual case of Paget's disease of bone. *Br Med J.* 1979; 1(6168):931.
91. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014; 94(1):25-34.
92. Stenbeck G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13(4):285-92.
93. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science.* 1997; 276(5310):266-9.
94. Ross FP. *Osteoclast Biology and Bone Resorption. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 8th edition. Washington, DC: The American Society for Bone and Mineral Research. John Wiley & Sons, Inc; 2013.
95. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 3):377-81.

96. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008; 29(2):155-92.
97. Ferrari-Lacraz S, Ferrari S. Effects of RANKL Inhibition on Inflammation and Immunity. *Ibms Bonekey.* 2009; 6(3):116-26.
98. Michou L, Collet C, Morissette J, Audran M, Thomas T, Gagnon E, et al. Epidemiogenetic study of French families with Paget's disease of bone. *Joint Bone Spine.* 2012; 79(4):393-8.
99. Kanis JA. Pathophysiology and treatment of Paget's disease of bone. London: Martin Dunitz; 1991.
100. Ralston SH. Pathogenesis of Paget's disease of bone. *Bone.* 2008; 43(5):819-25.
101. Siris E, Roodman GD. Paget's disease of bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 7th ed. Washington, DC: The American Society for Bone and Mineral Research. Rosen CJ, Compston JE, Lian JB; 2008.
102. Menea C, Reddy SV, Kurihara N, Maeda H, Anderson D, Cundy T, et al. Enhanced RANK ligand expression and responsiveness of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *J Clin Invest.* 2000; 105(12):1833-8.
103. Naot D, Bava U, Matthews B, Callon KE, Gamble GD, Black M, et al. Differential gene expression in cultured osteoblasts and bone marrow stromal cells from patients with Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(2):298-309.
104. Layfield R, Alban A, Mayer RJ, Lowe J. The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001; 27(3):171-9.
105. Menea C, Barsony J, Reddy SV, Cornish J, Cundy T, Roodman GD. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 hypersensitivity of osteoclast precursors from patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(2):228-36.
106. Neale SD, Smith R, Wass JA, Athanasou NA. Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and RANKL. *Bone.* 2000; 27(3):409-16.
107. Kurihara N, Reddy SV, Araki N, Ishizuka S, Ozono K, Cornish J, et al. Role of TAFII-17, a VDR binding protein, in the increased osteoclast formation in Paget's Disease. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(7):1154-64.
108. Nagy ZB, Gergely P, Donáth J, Borgulya G, Csanád M, Poór G. Gene expression profiling in Paget's disease of bone: upregulation of interferon signaling pathways in pagetic monocytes and lymphocytes. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(2):253-9.
109. Baron R. Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements. *General Principles of Bone Biology. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 5th ed. Washington DC: The American Society for Bone and Mineral Research. Favus MJ; 2003.p 1-8.
110. Hocking L, Slee F, Haslam SI, Cundy T, Nicholson G, van Hul W, et al. Familial Paget's disease of bone: patterns of inheritance and frequency of linkage to chromosome 18q. *Bone.* 2000; 26(6):577-80.
111. Usategui-Martín R, Gestoso-Uzal N, Calero-Paniagua I, De Pereda JM, Del Pino-Montes J, González-Sarmiento R. A mutation in p62 protein (p. R321C), associated to Paget's disease of bone, causes a blockade of autophagy and an activation of NF-kB pathway. *Bone.* 2020; 133:115265.
112. Galson DL, Roodman GD. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *J Bone Metab.* 2014; 21(2):85-98.

113. Hosking DJ. Paget's disease of bone. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 283(6293):686-8.
114. Rebel A, Basle M, Pouplard A, Malkani K, Filmon R, Lepatezour A. Towards a viral etiology for Paget's disease of bone. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981;3(4-5):235-8.
115. Mills BG, Yabe H, Singer FR. Osteoclasts in human osteopetrosis contain viral-nucleocapsid-like nuclear inclusions. *J Bone Miner Res*. 1988; 3(1):101-6.
116. Bianco P, Silvestrini G, Ballanti P, Bonucci E. Paramyxovirus-like nuclear inclusions identical to those of Paget's disease of bone detected in giant cells of primary oxalosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;421(5):427-33.
117. Mills BG. Comparison of the ultrastructure of a malignant tumor of the mandible containing giant cells with Paget's disease of bone. *J Oral Pathol*. 1981; 10(3):203-15.
118. Roodman GD, Windle JJ. Paget disease of bone. *J Clin Invest*. 2005; 115(2):200-8.
119. Whyte MP. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1068:143-64.
120. Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, et al. A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(12):2315-29.
121. Reddy SV. Etiology of Paget's disease and osteoclast abnormalities. *J Cell Biochem*. 2004; 93(4):688-96.
122. Vallet M, Soares DC, Wani S, Sophocleous A, Warner J, Salter DM, et al. Targeted sequencing of the Paget's disease associated 14q32 locus identifies several missense coding variants in RIN3 that predispose to Paget's disease of bone. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(11):3286-95.
123. Morissette J, Laurin N, Brown JP. Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(Suppl 2):38-44.
124. Bolland MJ, Tong PC, Naot D, Callon KE, Wattie DJ, Gamble GD, et al. Delayed development of Paget's disease in offspring inheriting SQSTM1 mutations. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(3): 411-5.
125. Cundy T, Rutland MD, Naot D, Bolland M. Evolution of Paget's disease of bone in adults inheriting SQSTM1 mutations. *Clin Endocrinol*. 2015; 83(3):315-9.
126. Kurihara N, Hiruma Y, Zhou H, Subler MA, Dempster DW, Singer FR, et al. Mutation of the sequestosome 1 (p62) gene increases osteoclastogenesis but does not induce Paget disease. *J Clin Invest*. 2007;117(1):133-42.
127. Holdaway IM, Ibbertson HK, Wattie D, Scragg R, Graham P. Previous pet ownership and Paget's disease. *Bone Miner*. 1990; 8(1):53-8
128. Piga AM, Lopez-Abente G, Ibanez AE, Vadillo AG, Lanza MG, Jodra VM. Risk factors for Paget's disease: a new hypothesis. *Int J Epidemiol*. 1988; 17(1):198-201
129. Lever JH. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: a speculative hypothesis. *Bone*. 2002; 31(3):434-6.
130. Monfort J, Sala DR, Romero AB, Duró JC, Maymó J, Carbonell J. Epidemiological, clinical, biochemical, and imaging characteristics of monostotic and polyostotic Paget's disease. *Bone*. 1999; 24(5 Suppl):13S-14S
131. Rebel A, Malkani K, Basle M. Nuclear anomalies in osteoclasts in Paget's bone disease. *Nouv Press Med*. 1974; 3(20):1299-301.

132. Rebel A, Basle M, Pouplard A, Kouyoumdjian S, Filmon R, Lepatezour A. Viral antigens in osteoclasts from Paget's disease of bone. *Lancet*. 1980; 2(8190):344–6.
133. Morales A, Bachiller J, Rey JS. Características de la enfermedad de Paget en una amplia serie de pacientes de ámbito hospitalario. *Rev Esp Reumatología*. 2000; 27:346-51.
134. Hocking LJ, Mellis DJ, McCabe PS, Helfrich MH, Rogers MJ. Functional interaction between sequestosome-1/p62 and autophagy-linked FYVE-containing protein WDFY3 in human osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402(3):543–8.
135. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002; 160(1):255-63.
136. Teramachi J, Nagata Y, Mohammad K, Inagaki Y, Ohata Y, Guise T, et al. Measles virus nucleocapsid protein increases osteoblast differentiation in Paget's disease. *J Clin Invest*. 2016; 126(3): 1012–22.
137. Kurihara N, Hiruma Y, Yamana K, Michou L, Rousseau C, Morissette J, et al. Contributions of the measles virus nucleocapsid gene and the SQSTM1/p62(P392L) mutation to Paget's disease. *Cell Metab*. 2011; 13(1):23–34.
138. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res*. 2012; 2(4):397-413.
139. Gardner MJ, Barker DJ. Mortality from malignant tumours of bone and Paget's disease in the United States and in England and Wales. *Int J Epidemiol* 1978; 7(2):121-130.
140. Daroszewska A, van 't Hof RJ, Rojas JA, Layfield R, Landao-Basonga E, Rose L, et al. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSTM1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(14):2734-44.
141. Chamoux E, Couture J, Bisson M, Morissette J, Brown JP, Roux S. The p62 P392L mutation linked to Paget's disease induces activation of human osteoclasts. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(10):1668-80.
142. Collet C, Michou L, Audran M, Chasseigneaux S, Hilliquin P, Bardin T, et al. Paget's disease of bone in the French population: novel SQSTM1 mutations, functional analysis, and genotype-phenotype correlations. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(2):310-7.
143. Pick A. Osteitis deformans. *Lancet*. 1883; 2:1125–6.
144. Meunier PJ, Salson C, Mathieu L, Chapuy MC, Delmas P, Alexandre C, et al. Skeletal distribution and biochemical parameters of Paget's disease. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 217:37–44.
145. Morales-Piga AA, Rey-Rey JS, Corres-González J, García-Sagredo JM, López-Abente G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 1995; 10(4):663-70.
146. McCann EP, Henden L, Fifita JA, Zhang KY, Grima N, Bauer DC, et al. Evidence for polygenic and oligogenic basis of Australian sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet*. 2020: jmedgenet-2020-106866.
147. Siris ES, Ottman R, Flaster E, Kelsey JL. Familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 1991; 6(5):495-500.
148. Hocking LJ, Herbert CA, Nicholls RK, Williams F, Bennett ST, Cundy T, et al. Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic

- heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(5):1055–61.
149. Laurin N, Brown JP, Lemainque A, Duchesne A, Huot D, Lacourciere Y, et al. Paget disease of bone: mapping of two loci at 5q35-qter and 5q31. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(3):528–43.
 150. Fotino M, Haymovits A, Falk CT. Evidence for linkage between HLA and Paget's disease. *Transplant Proc.* 1977; 9(4):1867–8.
 151. Tilyard MW, Gardner RJ, Milligan L, Cleary TA, Stewart RD. A probable linkage between familial Paget's disease and the HLA loci. *Aust NZ J Med.* 1982; 12(5):498–500.
 152. Cody JD, Singer FR, Roodman GD, Otterund B, Lewis TB, Leppert M, et al. Genetic linkage of Paget disease of the bone to chromosome 18q. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(5):1117–22.
 153. Haslam SI, Van HW, Morales-Piga A, Balemans W, San-Millan JL, Nakatsuka K, et al. Paget's disease of bone: evidence for a susceptibility locus on chromosome 18q and for genetic heterogeneity. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(6):911–7.
 154. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet.* 2000; 24(1):45–8.
 155. Nakatsuka K, Nishizawa Y, Ralston SH. Phenotypic characterization of early onset Paget's disease of bone caused by a 27-bp duplication in the TNFRSF11A gene. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(8):1381–5.
 156. Good DA, Busfield F, Fletcher BH, Duffy DL, Kesting JB, Andersen J, et al. Linkage of Paget disease of bone to a novel region on human chromosome 18q23. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(2):517–25.
 157. Laurin N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(6):1582–8.
 158. Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Wani S, Goodman K, Fraser WD, et al. Common susceptibility alleles and SQSTM1 mutations predict disease extent and severity in a multinational study of patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(11):2338–46.
 159. Narain P, Pandey A, Gupta S, Gomes J, Bhatia R, Vivekanandan P. Targeted next-generation sequencing reveals novel and rare variants in Indian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2018; 71:265.e9-265.e14.
 160. Ralston SH, Albagha OM. Genetics of Paget's disease of bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2014; 12(3):263-71.
 161. Albagha OM, Wani SE, Visconti MR, Alonso N, Goodman K, Brandi ML, et al. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat Genet.* 2011; 43(7):685–9.
 162. Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet.* 2010; 42(6):520–4.
 163. Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2000; 18(4):177–84.
 164. Bouyer P, Sakai H, Itokawa T, Kawano T, Fulton CM, Boron WF, et al. Colony-stimulating factor-1 increases osteoclast intracellular pH and promotes survival via

- the electroneutral Na/HCO₃ cotransporter NBCn1. *Endocrinology*. 2007; 148(2):831–40.
165. Donáth J, Speer G, Kósa JP, Árvai K, Balla B, Juhász P, et al. Polymorphisms of CSF1 and TM7SF4 genes in a case of mild juvenile Paget's disease found using next-generation sequencing. *Croat Med J*. 2015; 56(2):145-51.
166. Gianfrancesco F, Rendina D, Di Stefano M, Mingione A, Esposito T, Merlotti D, et al. A nonsynonymous TNFRSF11A variation increases NFκB activity and the severity of Paget's disease. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(2):443-52.
167. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*. 2002; 295(5557):1077–9.
168. Obaid R, Wani SE, Azfer A, Hurd T, Jones R, Cohen P, et al. Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF-κB and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell Rep*. 2015; 13(6):1096-1102.
169. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science*. 2011; 333(6039):228-33.
170. Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol*. 2007; 17(16):1438–43.
171. Grandi P, Dang T, Pane N, Shevchenko A, Mann M, Forbes D, et al. Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell*. 1997; 8(10):2017–38.
172. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. DC-STAMP is essential for cell–cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med*. 2005; 202(3):345–51.
173. Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, et al. RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2004; 200(7):941–6.
174. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 2003; 72(1):80–4.
175. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002; 160(1):255-63.
176. Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*. 2004; 431(7005):205–11.
177. Smits P, Bolton AD, Funari V, Hong M, Boyden ED, Lu L, et al. Lethal skeletal dysplasia in mice and humans lacking the golgin GMAP-210. *N Engl J Med*. 2010; 362(3):206–16.
178. Usategui-Martin R, Garcia-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero- Paniagua I, Del Pino-Montes J, Gonzalez SR. Polymorphisms in autophagy genes are associated with paget disease of bone. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0128984
179. Daroszewska A, van 't Hof RJ, Rojas JA, Layfield R, Landao- Basonga E, Rose L, et al. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSMT1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(14): 2734-44.
180. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009; 137(6):1001-4.

181. McManus S, Roux S. The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. *J Mol Signal*. 2012; 7:1.
182. Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett*. 2007; 581(2):175-9.
183. Geetha T, Wooten MW. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett*. 2002; 512(1-3):19-24.
184. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305(2):211-4.
185. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(2):95-100.
186. Sánchez-Martín P, Komatsu M. p62/SQSTM1 - steering the cell through health and disease. *J Cell Sci*. 2018; 131(21):jcs222836.
187. Rea SL, Walsh JP, Layfield R, Ratajczak T, Xu J. New insights into the role of sequestosome 1/p62 mutant proteins in the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Endocr Rev*. 2013; 34(4):501-24.
188. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(4):1566-71.
189. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78:769-96.
190. Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J*. 2000; 19(7):1576-86.
191. Durán A, Serrano M, Leitges M, Flores JM, Picard S, Brown JP, et al. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell*. 2004; 6(2):303-9.
192. Long J, Garner TP, Pandya MJ, Craven CJ, Chen P, Shaw B, et al. Dimerisation of the UBA domain of p62 inhibits ubiquitin binding and regulates NF-kappaB signalling. *J Mol Biol*. 2010; 396(1):178-94.
193. Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Payá CV, Moscat J. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(3):2180-8.
194. Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG. Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem*. 2007; 282(6):4102-12.
195. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15(6):457-75.
196. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21(7):267-71.
197. Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley W, et al. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(5):1858-66.
198. Wooten MW, Geetha T, Babu JR, Seibenhener ML, Peng J, Cox N, et al. Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*. 2008; 283(11):6783-9.
199. Ang E, Pavlos NJ, Rea SL, Qi M, Chai T, Walsh JP, et al. Proteasome inhibitors impair RANKL-induced NF-kappaB activity in osteoclast-like cells via disruption of

- p62, TRAF6, CYLD, and I κ B signaling cascades. *J Cell Physiol.* 2009; 220(2):450-9.
200. Tsakiri EN, Trougakos IP. The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 314:171-237.
 201. Buchberger A. From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol.* 2002; 12(5):216-21.
 202. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(18):8055-68.
 203. Schrader EK, Harstad KG, Matouschek A. Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(11):815-22.
 204. Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(15):2397-406.
 205. Goode A, Layfield R. Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol.* 2010; 63(3):199-203.
 206. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011; 147(4):728-41.
 207. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol.* 2018; 20(5):521-527.
 208. Casas-Avila L, Cruz-Arenas E, Ponce-de-León-Suárez V, Sánchez-Bringas G, Olivares-Bañuelos B, Chávez-Heres T, et al. High risk of lumbar spine osteoporosis with the RANK rs3018362 polymorphism. *Gynecol Endocrinol.* 2019; 35(11):981-984.
 209. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282(33):24131-45.
 210. Haddaway MJ, Davie MW, McCall IW, Howdle S. Effect of age and gender on the number and distribution of sites in Paget's disease of bone. *Br J Radiol.* 2007; 80(955):532-6.
 211. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab.* 2014; 21(4):233-41.
 212. Donohue E, Balgi AD, Komatsu M, Roberge M. Induction of Covalently Crosslinked p62 Oligomers with Reduced Binding to Polyubiquitinated Proteins by the Autophagy Inhibitor Verteporfin. *PLoS One.* 2014; 9(12):e114964.
 213. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol.* 2010; 32(4):431-6.
 214. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(7):458-67.
 215. Nagaoka U, Kim K, Jana NR, Doi H, Maruyama M, Mitsui K, et al. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem.* 2004; 91(1):57-68.
 216. Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport.* 2001; 12(10):2085-90.
 217. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407(6805):770-6.
 218. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004; 116(2):205-19.
 219. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(5):405-13.

220. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*. 2009; 137(4):721-35.
221. Brandwood CP, Hoyland JA, Hillarby MC, Berry JL, Davies M, Selby PL, et al. Apoptotic gene expression in Paget's disease: a possible role for Bcl-2. *J Pathol*. 2003; 201(3):504-12.
222. Michou L, Chamoux E, Couture J, Morissette J, Brown JP, Roux S. Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone. *Bone*. 2010; 46(3):598-603.
223. Chamoux E, Couture J, Bisson M, Morissette J, Brown JP, Roux S. The p62 P392L mutation linked to Paget's disease induces activation of human osteoclasts. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(10):1668-80.
224. Xu Y, Morse LR, da Silva RA, Odgren PR, Sasaki H, Stashenko P, et al. PAMM: a redox regulatory protein that modulates osteoclast differentiation. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13(1):27-37.
225. Kim H, Jung Y, Shin BS, Kim H, Song H, Bae SH, et al. Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2. *J Biol Chem*. 2010; 285(45):34419-28.
226. Yip KH, Zheng MH, Steer JH, Giardina TM, Han R, Lo SZ, et al. Thapsigargin modulates osteoclastogenesis through the regulation of RANKL-induced signaling pathways and reactive oxygen species production. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(8):1462-71.
227. Hinoi E, Fujimori S, Wang L, Hojo H, Uno K, Yoneda Y. Nrf2 negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2006; 281(26):18015-24.
228. Königsberg FM. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica*. 2007; 26(1):18-25.
229. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*. 2015; 88(Pt B):93-100.
230. Chen Y, Xiong DH, Yang TL, Yang F, Jiang H, Zhang F, et al. Variations in RANK gene are associated with adult height in Caucasians. *Am J Hum Biol*. 2007; 19(4):559-65.
231. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem*. 2006; 281(34):24756-68.
232. Fukutomi T, Takagi K, Mizushima T, Ohuchi N, Yamamoto M. Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(5):832-46.
233. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(22):8137-51.
234. Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(2):493-502.
235. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. Regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr Opin Toxicol*. 2016; 1:54-61.

236. 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.
237. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem.* 2010; 285(29):22576-91.
238. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011; 85(4):241-72.
239. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34(4):176-88.
240. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(52):20567-74.
241. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(3):213-23.
242. Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol.* 2013; 32(5):220-7..
243. Copple IM, Lister A, Obeng AD, Kitteringham NR, Jenkins RE, Layfield R, et al. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J Biol Chem.* 2010; 285(22):16782-8.
244. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell.* 2013; 51(5):618-31.
245. Riley BE, Kaiser SE, Kopito RR. Autophagy inhibition engages Nrf2-p62 Ub-associated signaling. *Autophagy.* 2011; 7(3):338-40.
246. Kim JE, You DJ, Lee C, Ahn C, Seong JY, Hwang JI. Suppression of NF-kappaB signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal.* 2010; 22(11):1645-54.
247. Hocking LJ, Lucas GJ, Daroszewska A, Cundy T, Nicholson GC, Donath J, et al. Novel UBA domain mutations of SQSTM1 in Paget's disease of bone: genotype phenotype correlation, functional analysis, and structural consequences. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(7):1122-7.
248. Yip KH, Feng H, Pavlos NJ, Zheng MH, Xu J. p62 ubiquitin binding-associated domain mediated the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced osteoclast formation: a new insight into the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Am J Pathol.* 2006; 169(2):503-14.
249. Hocking LJ, Lucas GJ, Daroszewska A, Mangion J, Olavesen M, Cundy T, et al. Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(22):2735-9.
250. Beyens G, Van HE, Van DK, Fransen E, Devogelaer JP, Vanhoenacker F, et al. Evaluation of the role of the SQSTM1 gene in sporadic Belgian patients with Paget's disease. *Calcif Tissue Int.* 2004; 75(2):144-52.
251. Falchetti A, Di Stefano M, Marini F, Del Monte F, Mavilia C, Strigoli D, et al. Two novel mutations at exon 8 of the Sequestosome 1 (SQSTM1) gene in an Italian series of patients affected by Paget's disease of bone (PDB). *J Bone Miner Res.* 2004; 19(6):1013-7.

252. Johnson-Pais TL, Wisdom JH, Weldon KS, Cody JD, Hansen MF, Singer FR, et al. Three novel mutations in SQSTM1 identified in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(10):1748–53.
253. Gu JM, Zhang ZL, Zhang H, Hu WW, Wang C, Yue H, et al. Thirteen Chinese patients with sporadic Paget's disease of bone: clinical features, SQSTM1 mutation identification, and functional analysis. *J Bone Miner Metab*. 2012; 30(5):525–33.
254. Tang Z, Liu F, Pang Y. Seven cases of a family with hereditary Paget's disease of bone. *Chin J Endocrinol Metab*. 2016; 15:372.
255. Falchetti A, Di Stefano M, Marini F, Ortolani S, Ulivieri MF, Bergui S, et al. Genetic epidemiology of Paget's disease of bone in Italy: sequestosome1/p62 gene mutational test and haplotype analysis at 5q35 in a large representative series of sporadic and familial Italian cases of Paget's disease of bone. *Calcif. Tissue Int*. 2009; 84(1):20-37.
256. Michou L, Morissette J, Gagnon ER, Marquis A, Dellabadia M, Brown JP, et al. Novel SQSTM1 mutations in patients with Paget's disease of bone in an unrelated multiethnic American population. *Bone*. 2011; 48(3):456–60
257. Rea SL, Walsh JP, Ward L, Magno AL, Ward BK, Shaw B, et al. Sequestosome 1 mutations in Paget's disease of bone in Australia: prevalence, genotype/phenotype correlation, and a novel non- UBA domain mutation (P364S) associated with increased NFkappaB signaling without loss of ubiquitin binding. *J Bone Miner Res*. 2009; 24(7):1216–23
258. Lucas GJ, Hocking LJ, Daroszewska A, Cundy T, Nicholson GC, Walsh JP, et al. Ubiquitin-associated domain mutations of SQSTM1 in Paget's disease of bone: evidence for a founder effect in patients of British descent. *J Bone Miner Res* 2005; 20(2):227-31
259. Chung PY, Beyens G, Guañabens N, Boonen S, Papapoulos S, Karperien M, et al. Founder effect in different European countries for the recurrent P392L SQSTM1 mutation in Paget's Disease of Bone. *Calcif Tissue Int*. 2008; 83(1):34-42.
260. Eekhoff EW, Karperien M, Houtsma D, Zwinderman AH, Dragoiescu C, Kneppers AL, et al. Familial Paget's disease in the Netherlands: occurrence, identification of new mutations in the sequestosome 1 gene, and their clinical associations. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(5):1650–4
261. Visconti MR, Langston AL, Alonso N, Goodman K, Selby PL, Fraser WD, et al. Mutations of SQSTM1 are associated with severity and clinical outcome in paget disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(11):2368–73
262. Layfield R, Shaw B. Ubiquitin-mediated signalling and Paget's disease of bone. *BMC Biochem*. 2007; 8 Suppl 1(Suppl 1):S5.
263. Ciani B, Layfield R, Cavey JR, Sheppard PW, Searle MS. Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J Biol Chem*. 2003; 278(39):37409-12.
264. Wright T, Rea SL, Goode A, Bennett AJ, Ratajczak T, Long JE, et al. The S349T mutation of SQSTM1 links Keap1/Nrf2 signalling to Paget's disease of bone. *Bone*. 2013; 52(2):699–706.
265. Najat D, Garner T, Hagen T, Shaw B, Sheppard PW, Falchetti A, et al. Characterization of a non-UBA domain missense mutation of sequestosome 1 (SQSTM1) in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2009; 24(4):632-42.
266. Merchant A, Smielewska M, Patel N, Akunowicz JD, Saria EA, Delaney JD, et al. Somatic mutations in SQSTM1 detected in affected tissues from patients with sporadic Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2009; 24(3):484–94.

267. Guay-Bélanger S, Picard S, Gagnon E, Morissette J, Siris ES, Orcel P, et al. Detection of SQSTM1/P392L post-zygotic mutations in Paget's disease of bone. *Hum Genet.* 2015; 134(1):53-65.
268. Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R. SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res.* 2014; 325(1):27-37.
269. Rubino E, Rainero I, Chiò A, Rogaeva E, Galimberti D, Fenoglio P, et al; TODEM Study Group. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2012; 79(15):1556-62.
270. van der Zee J, Van Langenhove T, Kovacs GG, Dillen L, Deschamps W, Engelborghs S, et al. Rare mutations in SQSTM1 modify susceptibility to frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* 2014; 128(3):397-410.
271. Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2011; 68(11):1440-6.
272. Teysou E, Takeda T, Lebon V, Boillée S, Doukouré B, Bataillon G, et al. Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2013; 125(4):511-22.
273. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Isono C, et al. Mutations in the gene encoding p62 in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2013; 80(5):458-63.
274. Kwok CT, Morris A, de Belleruche JS. Sequestosome-1 (SQSTM1) sequence variants in ALS cases in the UK: prevalence and coexistence of SQSTM1 mutations in ALS kindred with PDB. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(4):492-6.
275. Foster AD, Rea SL. The role of sequestosome 1/p62 protein in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. *Neural Regen Res.* 2020; 15(12):2186-94.
276. Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet.* 2004; 36(4):377-81.
277. Kimonis VE, Mehta SG, Fulchiero EC, Thomasova D, Pasquali M, Boycott K, et al. Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(6):745-57.
278. Kimonis VE, Kovach MJ, Waggoner B, Leal S, Salam A, Rimer L, et al. Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone. *Genet Med.* 2000; 2(4):232-41.
279. Gennari L, Gianfrancesco F, Di Stefano M, Rendina D, Merlotti D, Esposito T, et al. SQSTM1 gene analysis and gene-environment interaction in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(6):1375-84.
280. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009; 2(1):56-64.
281. Ralston SH, Taylor JP. Rare Inherited forms of Paget's Disease and Related Syndromes. *Calcif Tissue Int.* 2019; 104(5):501-516.
282. Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(18):2119-27.
283. Sparks AB, Peterson SN, Bell C, Loftus BJ, Hocking L, Cahill DP, et al. Mutation screening of the TNFRSF11A gene encoding receptor activator of NF kappa B

- (RANK) in familial and sporadic Paget's disease of bone and osteosarcoma. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68(3):151-5.
284. Whyte MP, Hughes AE. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(1):26-9.
285. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132(1):27-42.
286. Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, Ralston S, Hocking L, Vanhoenacker F, et al. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone. *Bone.* 2001; 28(1):104-7.
287. Marco-Mingot M, San-Millán JL, Wuyts W, Bachiller-Corral J, Van Hul W, Morales-Piga AA. Lack of mutations in the RANK gene in Spanish patients with Paget disease of bone. *Clin Genet.* 2001; 60(1):86-8.
288. Mills BG, Singer FR. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. *Science.* 1976; 194(4261):201-2.
289. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today.* 2000; 21(10):495-502.
290. Vellenga CJ, Pauwels EK, Bijvoet OL, Frijlink WB, Mulder JD, Hermans J. Untreated Paget disease of bone studied by scintigraphy. *Radiology.* 1984; 153(3):799-805.
291. Lucas GJ, Daroszewska A, Ralston SH. Contribution of genetic factors to the pathogenesis of Paget's disease of bone and related disorders. *J Bone Miner Res.* 2006; 21 Suppl 2:P31-7
292. Takata S, Yasui N, Nakatsuka K, Ralston SH. Evolution of understanding of genetics of Paget's disease of bone and related diseases. *J Bone Miner Metab.* 2004; 22(6):519-23.
293. Le Ber I, Camuzat A, Guerreiro R, Bouya-Ahmed K, Bras J, Nicolas G, et al; French Clinical and Genetic Research Network on FTD/FTD-ALS. SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* 2013; 70(11):1403-10.
294. Bakwin H, Eiger MS. Fragile bones and macrocranium. *J Pediatr.* 1956; 49(5):558-64.
295. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 2002; 347(3):175-84.
296. Cundy T. Is the prevalence of Paget's disease of bone decreasing? *J Bone Miner Res.* 2006; 21 Suppl 2:P9-13.
297. Chong B, Hegde M, Fawcner M, Simonet S, Cassinelli H, Coker M, et al; International Hyperphosphatasia Collaborative Group. Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(12):2095-104.
298. Middleton-Hardie C, Zhu Q, Cundy H, Lin JM, Callon K, Tong PC, et al. Deletion of aspartate 182 in OPG causes juvenile Paget's disease by impairing both protein secretion and binding to RANKL. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(3):438-45.
299. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(7):1245-55.

300. Trainor D, Lewis G, Hughes AE. Analysis of the genes encoding RANK, RANK-ligand and osteoprotegerin in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 2001; 67:489.
301. Daroszewska A, Hocking LJ, McGuigan FE, Langdahl B, Stone MD, Cundy T, et al. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(9):1506-11.
302. Beyens G, Daroszewska A, de Freitas F, Franssen E, Vanhoenacker F, Verbruggen L, et al. Identification of sex-specific associations between polymorphisms of the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, and Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(7):1062-71
303. Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L, et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet.* 2007; 39(8):960-2.
304. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997; 390(6656):175-9.
305. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999; 13(18):2412-24.
306. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2964-71.
307. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999; 397(6717):315-23.
308. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000; 103(1):41-50.
309. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-KappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(3):1002-13.
310. Chen G, Sirkar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer.* 2006; 107(2):289-98
311. Wallace RG, Barr RJ, Osterberg PH, Mollan RA. Familial expansile osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; (248):265-77.
312. Hughes AE, Shearman AM, Weber JL, Barr RJ, Wallace RG, Osterberg PH, et al. Genetic linkage of familial expansile osteolysis to chromosome 18q. *Hum Mol Genet.* 1994; 3(2):359-61.
313. Harinck HI, Bijvoet OL, Vellenga CJ, Blanksma HJ, Frijlink WB. Relation between signs and symptoms in Paget's disease of bone. *Q J Med.* 1986; 58(226):133-51.
314. Whyte MP, Mills BG, Reinus WR, Podgornik MN, Roodman GD, Gannon FH, et al. Expansile skeletal hyperphosphatasia: a new familial metabolic bone disease. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(12):2330-44.
315. Whyte MP, Tau C, McAlister WH, Zhang X, Novack DV, Preliasco V, et al. Juvenile Paget's disease with heterozygous duplication within TNFRSF11A encoding RANK. *Bone.* 2014; 68:153-61.

316. Schafer AL, Mumm S, El-Sayed I, McAlister WH, Horvai AE, Tom AM, et al. Panostotic expansile bone disease with massive jaw tumor formation and a novel mutation in the signal peptide of RANK. *J Bone Miner Res.* 2014; 29(4):911-21.
317. Chung PY, Beyens G, Riches PL, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Jennes K, et al. Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(12):2592-605.
318. Marsters SA, Frutkin AD, Simpson NJ, Fendly BM, Ashkenazi A. Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *J Biol Chem.* 1992; 267(9):5747-50.
319. Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol.* 2010; 184(12):6910-9.
320. Grasmann C, Unger N, Hövel M, Arweiler-Harbeck D, Herrmann R, Schündeln MM, et al. Loss of Functional Osteoprotegerin: More Than a Skeletal Problem. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102(1):210-9.
321. Naot D, Choi A, Musson DS, Simsek Kiper PÖ, Utine GE, Boduroglu K, et al. Novel homozygous mutations in the osteoprotegerin gene TNFRSF11B in two unrelated patients with juvenile Paget's disease. *Bone.* 2014; 68:6-10.
322. Whyte MP, Singhellakis PN, Petersen MB, Davies M, Totty WG, Mumm S. Juvenile Paget's disease: the second reported, oldest patient is homozygous for the TNFRSF11B "Balkan" mutation (966_969delTGACinsCTT), which elevates circulating immunoreactive osteoprotegerin levels. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(6):938-46.
323. Janssens K, de Vernejoul MC, de Freitas F, Vanhoenacker F, Van Hul W. An intermediate form of juvenile Paget's disease caused by a truncating TNFRSF11B mutation. *Bone.* 2005; 36(3):542-8.
324. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003; 423(6937):349-55.
325. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 2015; 282(24):4672-8.
326. Zapata, C.H., Morales, R.P., Jara, G.M. Papel del sistema ubiquitina proteasoma en la espermatogénesis. *Int. J. Med. Surg. Sci.* 2015; 2(4):621-34.
327. Censo de población y vivienda 2010. Instituto Nacional de Estadística. Instituto de Estadística de Cataluña.
328. Pons F, Alvarez L, Peris P, Guañabens N, Vidal-Sicart S, Monegal A, et al. Quantitative evaluation of bone scintigraphy in the assessment of Paget's disease activity. *Nucl Med Commun.* 1999; 20(6):525-8.
329. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016; 21:29.

