

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE MAGNITUDES BIOQUÍMICAS Y  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA EVOLUCIÓN  
ÓSEA DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO  
TRAS PARATIROIDECTOMÍA**

Raúl Francisco Rigo Bonnin  
BARCELONA 2008

Trabajo de investigación presentado para optar al grado de Doctor en  
Bioquímica Clínica y Patología Molecular

Dirigida por los Doctores Miguel Ángel Navarro Moreno y

Pedro Alía Ramos

**Miguel Ángel Navarro Moreno**, Doctor en Medicina, Jefe de Sección de Bioquímica Clínica. Sección de Bioquímica Hormonal y Génica. Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; y

**Pedro Alía Ramos**, Doctor en Biología, Facultativo Especialista de Bioquímica Clínica. Sección de Bioquímica Hormonal y Génica. Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona;

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado ESTUDIO DE MAGNITUDES BIOQUÍMICAS Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA EVOLUCIÓN ÓSEA DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO TRAS PARATIROIDECTOMÍA, de la que es autor Raúl Francisco Rigo Bonnín, se ha realizado bajo nuestra dirección en el Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge para optar al grado de Doctor en Bioquímica Clínica y Patología Molecular

L'Hospitalet de Llobregat, 22 de septiembre de 2008

Raúl Francisco Rigo Bonnín

Miguel Ángel Navarro Moreno

Pedro Alía Ramos

# AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis:

Al Dr. Miguel Ángel Navarro Moreno, director de esta Tesis, amigo y mentor, que ha contribuido no sólo a afianzar los más detallados aspectos de mi especialización sino aumentar la confianza en mis propios criterios. Además, debo agradecerle su continuo apoyo tanto en el ámbito personal como en el profesional.

Al Dr. Pedro Alía Ramos, director de esta Tesis, a quien admiro por su calidad científica, por su incesante afán por la enseñanza y por su entusiasmo. Además, debo agradecerle su perseverancia y apoyo prestado a la hora de escribir esta Tesis.

A los doctores Xavier Fuentes Arderiu, Pilar Rosel Soria, Dolors Dot Bach, José Valero Politi, M<sup>a</sup> José Castro Castro, Aurora Blanco Font, Carme Ferrer Isamat, Montserrat Vives Segalà, Joaquim Riera Masgrau y M<sup>a</sup> José Castiñeiras Lacambra por enseñarme todo sobre esta profesión.

A mis compañeros, amigos y a todo el personal del Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge, por su colaboración y apoyo prestado.

A los Servicios de Endocrinología y Cirugía General Digestiva del Hospital Universitari de Bellvitge de donde procedían los pacientes estudiados en esta Tesis, y al Servicio de Reumatología del mismo hospital por la colaboración prestada.

A los pacientes incluidos en esta Tesis, sin los cuales no hubiésemos podido llevar a cabo esta tarea.

*A mis padres, a mi hermano y a mi abuela,  
a quienes les debo todo*

# ÍNDICE

<b>0 ABREVIATURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 GLÁNDULAS PARATIROIDES .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Anatomofisiología de las glándulas paratiroides .....	1
1.1.2 Paratirina (PTH) .....	3
1.1.2.1 Biosíntesis .....	3
1.1.2.2 Regulación de la biosíntesis intracelular .....	4
1.1.2.3 Metabolismo y fragmentos circulantes .....	4
1.1.2.4 Control de la secreción .....	5
1.1.2.5 Función biológica .....	6
1.1.2.5.1 En el riñón .....	6
1.1.2.5.2 En el hueso .....	7
1.1.2.5.3 En el intestino .....	7
1.1.3 Vitamina D .....	7
1.1.3.1 Biosíntesis .....	8
1.1.3.2 25-Hidroxilación hepática .....	9
1.1.3.3 1- $\alpha$ -hidroxilación de la 25-(OH)-vitamina D <sub>3</sub> .....	9
1.1.3.4 Función biológica .....	11
1.1.3.4.1 En el intestino .....	11
1.1.3.4.2 En el hueso .....	12
1.1.3.4.3 En el riñón .....	12
1.1.4 Calcitonina .....	12
1.1.4.1 Biosíntesis, metabolismo y formas circulantes .....	13
1.1.4.2 Control de la secreción .....	14
1.1.4.3 Función biológica .....	14
1.1.4.3.1 En el hueso .....	15
1.1.4.3.2 En el riñón .....	15
1.1.5 Fisiopatología: hiperparatirpoidismo primario .....	16
1.1.5.1 Manifestaciones óseas .....	18
1.1.5.2 Manifestaciones renales .....	19
1.1.5.3 Síntomas debidos a la hipercalcemia .....	20
<b>1.2 FISIOPATOLOGÍA DEL HUESO .....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Factores sistémicos .....	24

# Índice y abreviaturas

1.2.2	Factores locales.....	25
1.2.3	Sistema OPG/RANKL.....	25
1.2.4	Marcadores bioquímicos de remodelado óseo .....	27
1.2.4.1	Fosfatasa alcalina (ALP).....	28
1.2.4.2	Osteocalcina (OC).....	29
1.2.4.3	C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I (CTx) .....	30
1.2.5	Osteopenia y osteoporosis .....	30
<b>1.3</b>	<b>GENÉTICA DEL HUESO.....</b>	<b>34</b>
1.3.1	Genes y polimorfismos candidatos .....	36
1.3.1.1	Gen del receptor de la vitamina D (VDR) .....	37
1.3.1.2	Gen del receptor de calcitonina (CTR) .....	39
1.3.1.3	Gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (COL1A1).....	40
1.3.1.4	Gen de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR).....	41
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
4.1	POBLACIÓN ESTUDIADA.....	48
4.2	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	49
4.3	PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA EMPLEADOS.....	52
4.3.1	Medición de la concentración de sustancia de calcio en el suero.....	52
4.3.2	Medición de la concentración de sustancia de fosfato en el suero .....	52
4.3.3	Medición de la concentración de masa de albúmina en el suero.....	52
4.3.4	Medición de la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en el suero .....	52
4.3.5	Medición de la concentración de sustancia de paratirina en el suero .....	53
4.3.6	Medición de la concentración de masa de C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I en el suero .....	53
4.3.7	Medición de la concentración de masa de osteocalcina en el suero .....	53
4.3.8	Medición de la concentración de sustancia de 25-hidroxi Vitamina D en el suero.....	54
4.3.9	Medición de la masa ósea por unidad de superficie (densidad mineral ósea) .....	55
4.3.10	Extracción de DNA de muestras .....	55
4.3.11	Estudio de los polimorfismos <i>Taq I</i> y <i>Apa I</i> del gen del receptor de la vitamina D y los polimorfismos <i>C677T</i> y <i>A1298C</i> del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa .....	56

4.3.11.1	Principio de medida.....	56
4.3.11.2	Procedimiento experimental.....	57
4.3.11.2.1	Preparación de reactivos.....	57
4.3.11.2.2	Polimorfismos C677T y A1298C del gen de la 5,10-Metilentetrahidrofolato-reductasa .....	62
4.3.11.2.3	Polimorfismos Taq I y Apa I del gen del receptor de la vitamina D .....	65
4.3.12	Estudio de los polimorfismos <i>Bsm I</i> y <i>Fok I</i> del gen del receptor de la vitamina D, el polimorfismo <i>Alu I</i> del gen del receptor de calcitonina y el polimorfismo <i>Sp1</i> del gen de la cadena $\alpha$ del colágeno de tipo I (COL1A1) .....	68
4.3.12.1	Principio de medida.....	68
4.3.12.1.1	Preparación de reactivos.....	69
4.3.12.2	Proceso experimental .....	70
<b>4.4 PROCEDIMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO .....</b>		<b>75</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>		<b>78</b>
<b>5.1 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO, FOSFATO, 25-HIDROXI VITAMINA D Y PARATIRINA .....</b>		<b>78</b>
<b>5.2 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS.....</b>		<b>82</b>
5.2.1	Fosfatasa alcalina .....	83
5.2.2	C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I (CTX) .....	84
5.2.3	Osteocalcina .....	85
<b>5.3 EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA POR UNIDAD DE SUPERFICIE (DENSIDAD MINERAL ÓSEA).....</b>		<b>86</b>
<b>5.4 RELACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS EN LA MASA ÓSEA, PARATIRINA Y MARCADORES ÓSEOS.....</b>		<b>87</b>
5.4.1	Correlación entre las concentraciones preoperatorias de PTH y marcadores óseos con los cambios en la DMO .....	87
5.4.2	Correlación entre los cambios en las concentraciones de PTH y marcadores óseos en diferentes momentos con los cambios en la DMO .....	88
<b>5.5 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS.....</b>		<b>89</b>
<b>5.6 EVOLUCIÓN EN LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS SEGÚN LOS GENOTIPOS DE CADA POLIMORFISMO EN ESTUDIO .....</b>		<b>91</b>



5.6.1	Fosfatasa alcalina .....	92
5.6.2	C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I .....	97
5.6.3	Osteocalcina .....	101
<b>5.7</b>	<b>EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA SEGÚN LOS GENOTIPOS DE CADA POLIMORFISMO EN ESTUDIO .....</b>	<b>106</b>
5.7.1	Densidad mineral ósea en la zona lumbar .....	106
5.7.2	Densidad mineral ósea en la zona de la cadera .....	107
<b>5.8</b>	<b>INTERACCIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE DIFERENTES POLIMORFISMOS EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS.....</b>	<b>109</b>
5.8.1	Fosfatasa alcalina .....	110
5.8.2	C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I .....	111
5.8.3	Osteocalcina .....	113
<b>5.9</b>	<b>INTERACCIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE DIFERENTES POLIMORFISMOS EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA.....</b>	<b>115</b>
5.9.1	Densidad mineral ósea en la zona de la columna lumbar.....	115
5.9.2	Densidad mineral ósea en la zona de la cadera .....	116
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>145</b>

## 0 ABREVIATURAS

**1,25-(OH)<sub>2</sub>-vit D:** 1,25-dihidroxi-vitamina D

**A:** adenosina

**ALP:** fosfatasa alcalina

**AMPc:** monofosfato cíclico de adenosina

**ANOVA:** análisis de la varianza

**ASBMR:** Sociedad Americana para la Investigación Mineral del Hueso

**ATP:** trifosfato de adenosina

**AUC:** área bajo la curva

**C:** citosina

**c.cat.:** concentración catalítica

**c.masa:** concentración de masa

**c.sust.:** concentración de sustancia

**CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**CMO:** contenido mineral óseo

**COL1A1:** cadena alfa 1 del colágeno tipo I

**CTR:** receptor de calcitonina

**CTx:** C-Telopéptidos isomerizados del colágeno tipo I

**DE:** desviación estándar

**DMO:** densidad mineral ósea

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DPA:** absorciometría de doble fotón

- DXA:** absorcimetría dual por rayos x
- ECLIA:** inmunoanálisis electroquioluminiscente
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- g:** gramo
- G:** guanina
- GH:** somatotropina u hormona de crecimiento
- GMPc:** monofosfato cíclico de guanosina
- GTP:** trifosfato de guanosina
- HPTP:** hiperparatiroidismo primario
- hsp90:** proteína de shock térmico 90
- IC:** intervalo de confianza
- IFCC:** Federación Internacional de Química Clínica
- IL:** interleucina
- IL-1:** interleucina 1
- IL-6:** interleucina 6
- IUPAC:** Unión internacional de Química Pura y Aplicada
- kb:** kilobase
- kD:** kiloDalton
- kmol:** kilomol
- L:** litro
- LBD:** dominio de unión al ligando
- LDL:** lipoproteína de baja densidad
- µm:** micrometro
- µL:** microlitro
- M:** molaridad; mol/L

**MEN:** neoplasia endocrina múltiple

**mg:** miligramo

**min:** minuto

**mm:** milímetro

**mmol:** milimol

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos

**MTHFR:** 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa

**NIH:** Instituto Nacional de la Salud de EUA

**NAD<sup>+</sup>:** dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

**NADP<sup>+</sup>:** dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfatado (forma oxidada)

**NF-KB:** factor nuclear kappa  $\beta$

**NTx:** N-Telopéptidos isomerizados del colágeno tipo I

**OC:** osteocalcina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPG:** osteoprotegerina

**pb:** par de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PG:** prostaglandina

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub>

**PICP:** propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I

**PINP:** propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I

**pmol:** picomol

**PSP:** proteína secretada por la paratiroides

**PTH:** paratirina

**p/v:** relación peso/volumen

**RANK:** receptor del factor nuclear kappa  $\beta$

**RANKL:** ligando del receptor de factor nuclear kappa  $\beta$

**RNA:** ácido ribonucleico

**RXR:** receptor retinoide X

**SEQC:** Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular

**SNP:** polimorfismo de un único nucleótido

**SPA:** absorciometría de un fotón

**Sp1:** zona de empalme 1

**Srm:** suero

**T:** timina

**TMB:** 3, 3, 5, 5'-Tetrametilbenzidina

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral

**TRAP:** fosfatasa ácida resistente a tartrato

**Tris:** Tris-(hidroximetil)-aminometano

**UR:** unidades de remodelado óseo

**UV:** ultravioleta

**VDR:** receptor de la vitamina D

**VDRE:** elementos de respuesta a la vitamina D

**VIP:** péptido vasoactivo intestinal

**Vitamina D<sub>2</sub>:** ergocalciferol

**Vitamina D<sub>3</sub>:** colecalciferol

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

**v/v:** relación volumen/volumen

# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 GLÁNDULAS PARATIROIDES

### 1.1.1 Anatomofisiología de las glándulas paratiroides

Habitualmente existen cuatro glándulas paratiroides, aunque algunas personas pueden presentar entre seis y ocho (aproximadamente entre el (2 – 6,5) % de la población). Presentan una estructura elipsoidea plana, cuyo color es marrón, volviéndose amarillentas con la edad en relación con un mayor contenido graso <sup>(1)</sup>.

En el hombre, las glándulas paratiroides inferiores se originan en el endodermo de la tercera bolsa branquial y migran con el timo, lo que puede determinar una localización variable desde el ángulo de la mandíbula al mediastino anterior y, en ocasiones, una localización tan baja como el pericardio. Las glándulas paratiroides superiores derivan de la cuarta bolsa branquial, en íntima relación con el cuerpo ultimobranquial, del que se separan al incorporarse éste al tiroides, situándose a la altura del istmo tiroideo, cerca de la intersección de la arteria tiroidea media con el nervio recurrente laríngeo.

Su tamaño es de unos 4,5 mm y su peso de (30 – 50) mg cada una (algo superior en mujeres) <sup>(1, 2)</sup>.

Las glándulas paratiroides pueden localizarse en la cápsula de la glándula tiroides o estar incluidas en el tejido tiroideo, pero siempre rodeadas de una cápsula de tejido conjuntivo por la que penetran elementos vasculares y nerviosos.

Las glándulas paratiroides contienen tres tipos celulares: principales, oxifílicas y claras. Las células principales son las más abundantes y suelen disponerse en forma laminar o formando trabéculas. Son las responsables de la secreción de la

paratirina (PTH). Su tamaño es de (6 – 8)  $\mu\text{m}$  de diámetro y cabe distinguir dos variantes: las células principales oscuras (activas), que contienen numerosos gránulos secretores de la región de Golgi, y las pálidas (inactivas), ricas en glucógeno y pobres en gránulos secretores <sup>(1, 2)</sup>. En condiciones normales, la proporción entre las células inactivas y activas es de 5:1; en situaciones de hipercalcemia crónica la proporción se incrementa hasta 10:1. Las células oxifílicas presentan un diámetro de (8 – 12)  $\mu\text{m}$ , con un citoplasma granular eosinófilo debido a su riqueza en mitocondrias, y sin llegar a superar el 5 % de las células parenquimatosas. Su función es desconocida y se disponen aisladamente entre las células principales. Por último, las células claras son las de mayor tamaño, (10 – 15)  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran en ocasiones en las glándulas paratiroides y aunque no parecen estar asociadas con ninguna función secretora, llegan a ser abundantes en algunos casos de hiperplasia glandular <sup>(1)</sup>.

La principal función de las glándulas paratiroides es la secreción de paratirina (PTH), hormona que, junto con la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D (metabolito activo de la vitamina D) y la calcitonina, integran un complejo sistema endocrino que controla la homeostasis del calcio y del fósforo en todos los vertebrados, mediante la regulación del flujo de estos minerales entre el líquido extracelular y diversos compartimientos efectores “potencialmente activados” por éstos y que son el intestino, el hueso y los riñones.

Otros factores, como la dieta, agentes físicos, hormonas (somatotropina, tiroxina, folitropina, lutropina, cortisol, factores de crecimiento insulinoide, entre otras) intervienen también en diferentes aspectos de la regulación y modulación de las respuestas de estos órganos efectores a las hormonas controladoras del metabolismo fosfocálcico.



### 1.1.2 Paratirina (PTH)

La paratirina (PTH) es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos cuyo residuo aminoterminal es la serina y el carboxiterminal la glutamina, con una masa molar de 9,5 kDa (kD). La actividad biológica se localiza en la secuencia 1 – 34. Se ha establecido que uno de los genes para su codificación está ubicado en el brazo corto del cromosoma 11.

#### 1.1.2.1 Biosíntesis

El producto original de este gen es un precursor polipeptídico de 115 aminoácidos y masa molar de 13 kD que recibe el nombre de *prepro-PTH*. Es precisamente la secuencia “pre” la primera parte que surge del ribosoma, quedando por su carácter hidrofóbico adherida a la membrana del retículo endoplasmático. La función de este fragmento es localizar los puntos claves del retículo endoplásmico liso, generando una porosidad, por la que posteriormente penetrará la cadena formada en el interior del retículo endoplasmático. En éste, una peptidasa elimina este fragmento y comienza el plegamiento de la molécula. La conversión de *prepro-PTH* a *pro-PTH* probablemente ocurre durante el transporte del polipéptido en la cisterna del retículo endoplasmático rugoso, en cuestión de segundos. La *pro-PTH* formada contiene 90 aminoácidos y una masa molar de 10 kD. La escisión de otro hexapéptido permite la conversión de *pro-PTH* a PTH a los pocos minutos de haberse iniciado la síntesis de la pro-PTH. En este punto, la PTH se encuentra libre o bien empaquetada en gránulos secretores para su depósito y liberación. La hormona intacta (PTH 1 – 84) sufre al menos otra escisión, mediante la acción de la catepsina B, en los gránulos secretores para generar fragmentos carboxiterminales, que pueden ser liberados con la hormona intacta a la circulación. Ninguno de los precursores de la PTH

(*prepro-PTH* y *pro-PTH*) presenta actividad biológica valorable y no son detectados en la circulación. Las células principales también producen una glucoproteína (proteína secretada por las paratiroides [PSP]) simultáneamente con la PTH que ha sido involucrada en el transporte de la *pro-PTH* en el espacio cisterna <sup>(1, 2)</sup>.

### **1.1.2.2 Regulación de la biosíntesis intracelular**

Existe una vía degradativa para la PTH, sensible al calcio, en el interior de las células principales. Este mecanismo actúa modulando la secreción y el almacenamiento de la PTH: concentraciones plasmáticas de calcio elevadas lo estimulan y concentraciones disminuidas lo inhiben. La degradación de la PTH se lleva a cabo mediante proteólisis. El sistema adenilciclasa y el producto de esta enzima, el 3'5'-AMPc, son los agentes intermediarios en el control por el calcio de la secreción paratiroidea <sup>(1, 2)</sup>.

### **1.1.2.3 Metabolismo y fragmentos circulantes**

La PTH circulante es heterogénea y a ello contribuyen varios factores. En primer lugar, la glándula paratiroides secreta PTH intacta (1 – 84) y fragmentos carboxiterminales con las regiones media y carboxiterminal de la molécula. No hay datos que apoyen la secreción de fragmentos aminoterminales activos por la glándula paratiroides. Los fragmentos circulantes son el resultado de los secretados y de los derivados del metabolismo de la PTH en el hígado, el riñón y, en menor proporción, en el hueso. En el hígado (mediante las células de Kupfer) y en el riñón, la PTH intacta es escindida a fragmentos carboxiterminales y aminoterminales que no son metabolizados. Los fragmentos carboxiterminales son eliminados principalmente mediante la filtración glomerular, pero también lo son, aunque en menor proporción, los fragmentos aminoterminales y la PTH intacta. Se ha

demostrado un proceso de recaptación tubular que afecta sobre todo a los fragmentos aminoterminales. Así, mientras en el efluente venoso de la glándula paratiroides la PTH intacta puede constituir el 80 % de la secreción, a nivel periférico la contribución de los fragmentos la reduce al 10 %, representando los carboxiterminales la mayor proporción (80 %) y los aminoterminales una mínima fracción <sup>(1)</sup>.

Los fragmentos aminoterminales tienen actividad biológica, pero una vida media circulante corta, similar a la PTH intacta (alrededor de 10 minutos), mientras que los carboxiterminales son activos parcialmente presentando una vida media más larga (40 minutos).

### **1.1.2.4 Control de la secreción**

La secreción de PTH es inversamente proporcional a la concentración plasmática de calcio, con una elevada capacidad de regulación. Esta retroalimentación negativa significa la puesta en marcha de efectos de la PTH sobre el riñón, el hueso e, indirectamente, el intestino, para mantener la normocalcemia. En situaciones de hipercalcemia se secretan fragmentos carboxiterminales, además de disminuir la PTH intacta. El calcio ionizado plasmático es el principal determinante de la secreción de PTH <sup>(1, 2)</sup>.

La secreción de PTH también aumenta al disminuir la concentración de magnesio, siempre que la de calcio se mantenga normal. La perfusión de magnesio disminuye la secreción de PTH, estimándose su efecto en un tercio respecto al del calcio. En situaciones de reducción crónica de magnesio puede haber una secreción inadecuada de PTH, implicando posiblemente un deterioro en los mecanismos secretores de la misma <sup>(1, 2)</sup>.

### 1.1.2.5 Función biológica

La PTH es la principal hormona en el control y la protección del organismo frente a la hipocalcemia, regulando el intercambio mineral del hueso, riñón e intestino.

#### 1.1.2.5.1 En el riñón

La PTH produce:

- a) un incremento acusado en la excreción urinaria de fosfato, que es independiente de los cambios en el filtrado glomerular y que se lleva a cabo por una disminución de la reabsorción tubular proximal de este ión;
- b) un incremento en la reabsorción tubular de calcio y magnesio, y
- c) un incremento en la excreción urinaria de hidrogenocarbonato por inhibición de su reabsorción tubular proximal.

En situaciones de hipercalcemia crónica (hiperparatiroidismo primario) puede predominar la hipercalciuria, a pesar de la PTH elevada, lo que se explica porque la acción de esta hormona sobre el túbulo distal sólo afecta al 10 % que se reabsorbe a este nivel <sup>(1, 2)</sup>.

El 90 % del calcio filtrado es reabsorbido por un proceso independiente de la PTH no saturable ligado al transporte del sodio en el túbulo proximal y el asa de Henle. La PTH se liga a un receptor en la cara basal de la célula tubular, activando el sistema adenilciclase e incrementando el AMPc citosólico, el cual, al unirse a la subunidad reguladora de la proteincinasa del borde luminal, disocia a ésta de la subunidad catalítica. La fosforilación de proteínas de la membrana celular por la subunidad catalítica activada, inhibe el transporte de sodio y fosfato hacia el interior celular <sup>(1, 2)</sup>.

### 1.1.2.5.2 En el hueso

En el esqueleto la PTH estimula la resorción ósea. También estimula la formación de hueso nuevo, pero su efecto neto es aumentar la liberación de calcio y fosfato a la sangre <sup>(1, 2)</sup>.

La administración de PTH provoca inicialmente un estímulo de la osteolisis osteocitaria y la resorción ósea por los osteoclastos preexistentes, generación de nuevos osteoclastos y, por último, depresión de la función de los osteoblastos (retracción y disminución de la síntesis y del contenido proteico de estas células). A largo plazo, la PTH estimula la generación de factores de acoplamiento de la remodelación ósea, pudiendo llegar a sobrepasar la inhibición directa de los osteoblastos y a provocar diferenciación de células con función osteoblástica y formación de nuevo hueso. Dado que los osteoblastos tienen receptores para la PTH y los osteoclastos no, los efectos de esta hormona sobre los osteoclastos son mediados por los primeros. Se ha demostrado que la PTH es menos efectiva en promover la resorción ósea en ausencia de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D <sup>(1, 2)</sup>.

### 1.1.2.5.3 En el intestino

La PTH induce la síntesis renal de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D que, a su vez, estimula la absorción intestinal de calcio y fosfato <sup>(1, 2)</sup>.

## 1.1.3 Vitamina D

La vitamina D (calciferol) y sus metabolitos constituyen un grupo de compuestos esteroideos (secosteroles) que, mediante su metabolito activo, la 1,25-dihidroxi-vitamina D [1,25-(OH)<sub>2</sub>-vit D] intervienen en la regulación del metabolismo del calcio y del fosfato. La vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) y la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) son absorbidas por el tracto gastrointestinal a partir de los alimentos que las contienen,

tejidos animales, aceite de hígado de bacalao (vitamina D<sub>3</sub>); plantas, pan y levaduras irradiadas (vitamina D<sub>2</sub>), en un proceso de difusión pasiva que requiere sales biliares, para pasar a través del sistema linfático (ligadas a los quilomicrones) a la circulación general, donde circulan unidas a  $\alpha$ -globulinas (proteínas transportadoras) (1, 2).

### 1.1.3.1 Biosíntesis

En condiciones normales, la fuente más importante de vitamina D es su biosíntesis en las células epidérmicas (estrato granuloso). En la piel, la radiación ultravioleta del sol, transforma el 7-deshidrocolesterol en previtamina D<sub>3</sub>, en una reacción fotolítica no catalizada por enzimas. Posteriormente, es lentamente transformada a vitamina D<sub>3</sub>, la cual circula en la sangre ligada a una proteína transportadora (alfa-globulina) con una masa molar de 56 kD y una afinidad 200 veces mayor por la vitamina D<sub>3</sub> respecto a la previtamina D<sub>3</sub>. Esta proteína transportadora presenta un único centro activo en toda la molécula para todos los metabolitos de la vitamina D, a los que transporta, aunque con mayor afinidad por el 25-hidroxicolecalciferol [25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub>] que por la vitamina D o la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. De manera similar a la proteína transportadora de tiroxina, no se satura más allá del 3 % con vitamina D<sub>3</sub> en condiciones fisiológicas, por lo que es un gran reservorio potencial (1, 2).

Existe un control sobre las concentraciones endógenas de vitamina D<sub>3</sub>, puesto que a pesar de prolongadas exposiciones al sol, sólo hay mínimos incrementos. Esto se produce probablemente por regulación de la liberación de la vitamina D<sub>3</sub> en la piel y no por la inhibición de una 25-hidroxilasa hepática. El tejido adiposo y el músculo son los lugares de mayor depósito de vitamina D en el organismo.

### 1.1.3.2 25-Hidroxilación hepática

El 90 % de esta primera hidroxilación de la vitamina D con producción de 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub>, se lleva a cabo en el hígado y el resto en el riñón e intestino. De los dos sistemas implicados, el mitocondrial y el microsómico de los hepatocitos hay evidencias de que es en este último donde, en condiciones fisiológicas, se realiza la 25-hidroxilación mediante una enzima 25-hidroxilasa (E.C 1.14.13.15) <sup>(3)</sup>.

No existe inhibición retroactiva de la 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> sobre la 25-hidroxilasa, sino que la regulación parece estar influida por la concentración del sustrato. La relación entre el sustrato (vitamina D<sub>3</sub>) y el producto 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> no es lineal, aunque la respuesta disminuye proporcionalmente con el incremento del sustrato. El calcio, el fosfato o la PTH no influyen en la actividad de esta enzima, aunque la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> parece inhibirla.

La 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> es el metabolito más abundante en plasma, aunque es 100 veces menos potente en estimular la absorción intestinal del calcio que la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> <sup>(1, 2)</sup>.

### 1.1.3.3 1- $\alpha$ -hidroxilación de la 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub>

En el riñón, la 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> es hidroxilada en la posición 1 por una hidroxilasa (EC 1.14.13.13) <sup>(3)</sup> presente en las mitocondrias de los túbulos proximales, para formar la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, el metabolito más activo y potente biológicamente de la vitamina D, que induce la absorción intestinal de calcio y fosfato, al igual que la resorción ósea. La 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> circula a concentraciones bajas, alrededor de 70 pmol/L, con una vida media de (2 – 4) horas <sup>(1, 2)</sup>.

En el riñón se produce la segunda hidroxilación cuantitativamente más importante de la vitamina D. Mediante una 24-*R*-hidroxilasa (EC 1.17.99.3) <sup>(3)</sup> se forma la 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, presente en el plasma en concentraciones mayores, con una vida media de 6 horas y una regulación opuesta a la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. La actividad de la 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> es escasa y similar a la de su precursor, 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub>. La formación de estos dos compuestos, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> y 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, es esencial para la regulación del metabolismo mineral. Las enzimas involucradas están reguladas por la hipocalcemia-PTH y las concentraciones bajas de fosfato. En condiciones de normocalcemia se producirán ambas moléculas, aunque con mayor predominio de la 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. En la hipocalcemia se estimula la secreción de PTH, y ésta, a su vez, estimula la 1- $\alpha$ -hidroxilasa renal, con lo que se sintetiza más 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, que tiende a restaurar la normocalcemia, a la vez que se suprime la 24-hidroxilación. Con el incremento gradual de las concentraciones plasmáticas de calcio se produce una disminución de la síntesis de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> y de la actividad de la glándula paratiroides. Además del riñón, existe actividad tipo 1- $\alpha$ -hidroxilasa, en el hueso, el intestino y las plaquetas, y de tipo 24-hidroxilasa en el intestino, el cartílago y el hueso <sup>(1, 2)</sup>.

La hipofosfatemia incrementa las concentraciones de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> y disminuye la producción de 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. De forma similar a lo que ocurre con el calcio, la elevación del fosfato plasmático frena la producción de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> y estimula la síntesis de la 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>.

Las hormonas sexuales (estrógenos, testosterona, entre otras) tienen un efecto estimulante de la 1- $\alpha$ -hidroxilasa.



La somatotropina (GH), parece estimular la actividad de la 1- $\alpha$ -hidroxilasa, mientras que la calcitonina parece inhibirla.

Los glucocorticoides no parecen afectar a esta enzima y sí a las acciones biológicas de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>.

Existen alrededor de 20 metabolitos, identificados bioquímicamente, de la vitamina D. El ácido calcitrico, biológicamente inerte, es el principal metabolito de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> hallado en el intestino <sup>(1)</sup>.

La excreción de los metabolitos de la vitamina D tiene lugar fundamentalmente por la bilis y existe evidencia de una circulación enterohepática para la 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> y la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>.

### **1.1.3.4 Función biológica**

#### **1.1.3.4.1 En el intestino**

El calcio es absorbido por el tracto gastrointestinal (65 % en el íleon, 17 % en el yeyuno) por un proceso de difusión pasiva y por transporte activo. Este último proceso, es dependiente de la vitamina D y se caracteriza por la entrada de calcio a través de la membrana de las microvellosidades de las células intestinales, en contra de gradiente de concentración, y por la excreción activa del ión a la sangre por la membrana basal lateral. Ni la calcitonina ni la PTH intervienen directamente en esta absorción. El mecanismo de este proceso implica que la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> atraviese la membrana basal lateral de la célula de la mucosa intestinal e interaccione con un receptor específico. El complejo receptor—1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> es translocado al núcleo, induciendo la producción de un RNA mensajero (transcripción) que codifica las proteínas transportadoras del calcio y del fosfato. La

principal de estas proteínas presenta una masa molar de 15 kD y cuatro centros activos por molécula para el calcio <sup>(1)</sup>.

En el borde rugoso de las células intestinales también se han aislado otras dos enzimas: fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) <sup>(3)</sup> y una ATPasa dependiente del calcio (EC 3.6.3.8) <sup>(3)</sup>, que guardan menor relación con la absorción intestinal del calcio <sup>(1, 2)</sup>.

### **1.1.3.4.2 En el hueso**

La falta de vitamina D ocasiona un déficit en la mineralización de la matriz ósea, que en niños se manifiesta como raquitismo y en adultos como osteomalacia. La 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> promueve la resorción ósea, lo que, unido a su acción estimulante de la absorción neta de calcio en el intestino, favorece un ambiente rico en minerales en las zonas de remodelado óseo, haciendo posible la mineralización de la nueva matriz ósea. Se ha comprobado que estimula la diferenciación de progenitores de osteoclastos a células maduras. Este efecto es potenciado por la PTH <sup>(1)</sup>.

### **1.1.3.4.3 En el riñón**

La 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> provoca un aumento de la reabsorción tubular del calcio y del fosfato, aumentando las concentraciones plasmáticas de calcio. Por otro lado, la acción de aumentar la reabsorción tubular de fosfato, observada sobre todo en pacientes con deficiencia de vitamina D, podría en parte explicarse por la supresión del hiperparatiroidismo secundario acompañante <sup>(1)</sup>.

### **1.1.4 Calcitonina**

La calcitonina es un polipéptido de 32 aminoácidos, con estructura terciaria plegada, un puente disulfuro entre los aminoácidos 1 y 7 y un grupo amino en el aminoácido prolina carboxiterminal. Su masa molar es de 3,4 kD y para su actividad biológica

requiere la secuencia total de aminoácidos, así como la integridad del puente disulfuro y del grupo prolinamida <sup>(1, 2)</sup>.

Es una hormona polipeptídica secretada por las células C de la glándula tiroides en respuesta a la hipercalcemia, inhibiendo la resorción ósea. Las células responsables de su secreción tienen un núcleo grande y claro, con numerosos gránulos finos de calcitonina, y se localizan sobre todo en la parte media interna de los lóbulos tiroideos.

### **1.1.4.1 Biosíntesis, metabolismo y formas circulantes**

La biosíntesis de la calcitonina es compleja, localizándose su gen en el cromosoma 11. El gen codificador en el tiroides expresa preferentemente la calcitonina, mientras que, en el cerebro, el expresado es el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) <sup>(1)</sup>.

La calcitonina se forma a partir de una *prepro-calcitonina*, que contiene unos 141 aminoácidos y que posteriormente se escinde a *pro-calcitonina*. La calcitonina (tres veces inferior en tamaño) procede de la región media de este polipéptido, mientras que la katalcalcina deriva de los 21 aminoácidos aminoterminal. La katalcalcina es estudiada en la actualidad por sus efectos hipocalcemiantes y por ser secretada simultáneamente con la calcitonina en el carcinoma medular de tiroides. El CGRP es el producto alternativo originado en el cerebro, que presenta una potencia hipocalcemiante e inhibidora de la resorción ósea débil, en comparación con la calcitonina. Su efecto principal es la vasodilatación. Se han descifrado las secuencias polipeptídicas de la calcitonina de diferentes especies (humana, porcina, bovina, ovina, salmón y rata): 9 aminoácidos son comunes y todas tienen prolinamida carboxiterminal. Sin embargo, existen notables diferencias en cuanto a la potencia hipocalcemiante <sup>(1, 2)</sup>.

La metabolización de la calcitonina se realiza sobre todo por aclaramiento renal. Su vida media es de unos 10 minutos. Existe un proceso de filtración, reabsorción tubular y degradación en el riñón, con eliminación de cantidades muy pequeñas de calcitonina. La forma circulante de calcitonina en individuos sanos es una cadena polipeptídica de 32 aminoácidos, pero en pacientes con carcinoma medular de tiroides y, en menor proporción, en otras neoplasias (carcinoma bronquial) es heterogénea, ya que hay formas de elevada masa molar (7 - 60 kD) de calcitonina inmunorreactiva correspondientes a dímeros (enlace de dos cadenas de calcitonina por puentes disulfuro en sentido opuesto) o polímeros de la hormona sin actividad biológica, que llega a constituir el (50 – 80) % del material inmunorreactivo <sup>(1)</sup>.

### **1.1.4.2 Control de la secreción**

La calcitonina es segregada en respuesta a un aumento de la concentración plasmática de calcio. La disminución de este ion inhibe la secreción de calcitonina. Existe una correlación positiva entre las concentraciones de calcio y la calcitonina plasmática en individuos normales, cuando los valores de la concentración de calcio sobrepasan los 2,25 mmol/L. La PTH, la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, la secretina y las prostaglandinas no parecen modificar su secreción. En cambio, el magnesio, a dosis farmacológicas, es capaz de estimular su liberación <sup>(1, 2)</sup>.

### **1.1.4.3 Función biológica**

La importancia fisiológica de la calcitonina se desconoce. En clínica su deficiencia no provoca una afección definida, describiéndose sólo que pacientes con tiroidectomía total tienen más dificultad en el manejo de una sobrecarga cálcica en situaciones experimentales.

### **1.1.4.3.1 En el hueso**

La calcitonina inhibe la resorción ósea. Tras su administración, disminuyen los osteoclastos (ya que inhibe la formación de células precursoras y la diferenciación de osteoclastos preformados) y también la actividad de ciertas enzimas que aumentan con la PTH. Si la administración de calcitonina es prolongada, los osteoclastos pueden escapar de sus efectos (“fenómeno del escape”), lo cual se atribuye a una pérdida de la regulación del número y/o de la capacidad de afinidad de los receptores de la hormona. También está implicada en este proceso la aparición de osteoclastos no sensibles a la calcitonina. Este fenómeno podría explicar la falta de respuesta hipocalcémica sostenida en situaciones de hipercalcemia tumoral tratada con calcitonina.

La acción inhibidora de la resorción ósea no se acompaña de cambios en el calcio plasmático en condiciones normales. Este efecto óseo es mayor cuando hay incremento del remodelado óseo (crecimiento, enfermedad de Paget, etc.) o si previamente ha habido estimulación con vitamina D o PTH, pero siempre sin provocar una reducción de las concentraciones plasmáticas de calcio en adultos.

### **1.1.4.3.2 En el riñón**

Por otro lado, la calcitonina aumenta la excreción urinaria de calcio, fosfato, sodio, potasio y magnesio. Los efectos fosfatúricos no son mediados por la PTH, puesto que esta acción se manifiesta en su ausencia. Este efecto tiene lugar en el túbulo proximal, y el AMPc parece mediarlo de manera similar a como lo hace en el hueso. Cuando la dosis de calcitonina es muy elevada, la excreción de calcio puede disminuir probablemente en relación con la hipocalcemia transitoria que induce. Todas estas acciones renales son posiblemente sólo farmacológicas, pues para

provocar un aumento significativo de la excreción de sodio se requiere una dosis de calcitonina 100 veces mayor que la necesaria para descender la calcemia <sup>(1)</sup>.

### **1.1.5 Fisiopatología: hiperparatirpoidismo primario**

Los trastornos de las glándulas paratiroides son normalmente clasificados por el grado de producción de la hormona que generan: hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo.

Pese a existir diversas enfermedades relacionadas con las glándulas paratiroides como el hipoparatiroidismo e hiperparatiroidismo secundario o renal, en el presente trabajo sólo se hará mención al hiperparatiroidismo primario.

El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es una enfermedad caracterizada por hipersecreción de PTH que provoca hipercalcemia, por sus acciones sobre el riñón, el intestino y el hueso. La hipercalcemia es incapaz de suprimir la secreción aumentada de PTH, como lo hace en circunstancias normales. La hipercalcemia generalmente permanece constante durante muchos años, con pequeñas oscilaciones, aunque puede ser cíclica en algunas ocasiones.

El aumento de PTH induce una mayor síntesis por el túbulo renal de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>, lo que favorece la absorción intestinal del calcio. Asimismo, estimula la resorción ósea por los efectos combinados de la PTH y la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. Por último, también se incrementa la reabsorción tubular de calcio. Todo ello es responsable de la producción de la hipercalcemia.

Su prevalencia oscila entre el 1 y el 3 % en la población adulta. Su incidencia anual es de 250 nuevos casos por millón de habitantes y año. Afecta sobre todo a adultos, y el 85 % de los casos tienen más de 30 años, siendo mayor su frecuencia en la

séptima década y en mujeres postmenopáusicas. Es dos veces más frecuente en las mujeres que en los varones <sup>(1)</sup>.

La forma etiológica más frecuente del HPTP es la espontánea, aunque se han descrito casos familiares o bien formando parte del síndrome de neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipos I y II.

La lesión histológica causante del hiperparatiroidismo primario puede ser un adenoma, una hiperplasia o un carcinoma de las glándulas paratiroides. En el 80 % de los casos se encuentra un adenoma solitario, que suele localizarse en las glándulas paratiroides inferiores. El (6 – 10) % de ellos tienen una localización ectópica, intratiroidea, en el timo o en otra zona mediastínica. Suelen pesar entre (0,2 – 2) g, aunque pueden llegar a (10 – 20) g. A mayor tamaño del adenoma, más manifestaciones clínicas. Histológicamente, el adenoma se compone de un grupo homogéneo celular, en general células principales, y escasez de células grasas, adquiriendo el tumor un color marrón oscuro. Es infrecuente el hallazgo de adenomas múltiples <sup>(1)</sup>.

En el (15 – 20) % de los casos presentan hiperplasia de las cuatro glándulas paratiroides, por lo general de las células principales y en menor proporción de las células claras. La hiperplasia suele ser el hallazgo en los síndromes pluriglandulares con hiperparatiroidismo primario <sup>(1)</sup>.

Menos del 1 % de los pacientes presentan un carcinoma en una de las glándulas. Suelen ser lesiones funcionantes, de crecimiento lento y que metastatizan preferentemente por vía linfática. Sus manifestaciones clínicas óseas y renales, así como la hipercalcemia, suelen ser más intensas.

Los signos y síntomas mayores del hiperparatiroidismo primario, pueden clasificarse en óseos, renales o secundarios a la hipercalcemia:

### 1.1.5.1 Manifestaciones óseas

La lesión más frecuente es la osteopenia difusa o vertebral, complicada o no con fractura compresiva de los cuerpos vertebrales y la osteoporosis. La osteopenia del hiperparatiroidismo no siempre es homogénea o difusa, pudiendo afectar precozmente sobre todo el cráneo, las falanges y las clavículas. Con técnicas densitométricas se ha comprobado que más del 30 % tienen pérdida mineral, incluso las formas asintomáticas, por lo que puede considerarse una manifestación subclínica de la enfermedad <sup>(1)</sup>.

Las lesiones óseas clásicas del hiperparatiroidismo, observadas mediante radiografías del hueso, son: la osteopenia u osteoporosis, la resorción ósea subperióstica, fracturas, la osteosclerosis y las lesiones quísticas. La lesión más comunmente observada es la reabsorción o erosión subperióstica en las manos: en las falanges medias, sobre todo en su lado radial, hay pérdida del suave contorno externo, con desflecamiento. Con lentes de aumento se observan mejor las erosiones pequeñas en las placas radiográficas. También se advierten erosiones y destrucción del abultamiento de las falanges terminales. Hay lesiones similares en el hombro (tercio discal de la clavícula), la sínfisis del pubis y las articulaciones sacroilíacas. Estos hallazgos corresponden tanto al hiperparatiroidismo primario como al secundario. En el cráneo, los cambios erosivos confieren el aspecto moteado en sal y pimienta. Rara vez hay osteosclerosis, que es mucho más frecuente en el hiperparatiroidismo secundario asociado con insuficiencia renal, sobre todo en niños, pudiendo adoptar una forma localizada o difusa. La disminución o la pérdida de la lámina dura dentaria es frecuente en esta enfermedad, pero no revierte con la cirugía del adenoma.



### 1.1.5.2 Manifestaciones renales

Desde que las formas asintomáticas se diagnostican con mayor frecuencia, la incidencia de litiasis renal ha ido disminuyendo, hasta situarse en el (7 – 15) % actual, en la mitad de los cuales no da sintomatología. Sin embargo, el análisis por grupos de edad demuestra que en los menores de 60 años continúa siendo un síntoma de presentación <sup>(1)</sup>.

La repercusión renal inicial suele ser un defecto en la función tubular, que puede demostrarse en ausencia de litiasis renal o evidencia de infección. Suele haber incapacidad para concentrar la orina y, a la larga, hipostenuria, debido al bloqueo de la acción de la vasopresina sobre los túbulos renales causado por el calcio. También se ha observado una incapacidad para excretar ácidos, con acidosis hiperclorémica y consiguiente disminución del hidrogenocarbonato. Se asocian aminoaciduria, glucosuria y fosfaturia, todo ello favorecido por las frecuentes infecciones en pacientes con uropatías obstructivas. Los cambios anatómicos consisten en nefrocalcinosis y litiasis renal. La nefrocalcinosis no suele presentarse en pacientes con hiperparatiroidismo y litiasis renal, y sí en aquellos con insuficiencia renal moderada o intensa e hipercalcemia grave. Se caracteriza por la precipitación de calcio y fosfato en el epitelio tubular y el intersticio renal, por lo que se piensa que la disminución de la función renal la desencadena, lo cual, a su vez, la deteriora aún más.

Alrededor del 3 % de los pacientes con litiasis cálcica presentan hiperparatiroidismo primario, pero suelen transcurrir más de 3 años, como término medio, antes de establecerse este diagnóstico. Si se estudia a los pacientes con litiasis renal cálcica recidivante, el (5 – 10) % presenta hiperparatiroidismo en ausencia de afectación

ósea. Los cálculos más frecuentes son de fosfato cálcico puros, oxalatos cálcicos o, más a menudo, mixtos <sup>(1)</sup>.

### 1.1.5.3 Síntomas debidos a la hipercalcemia

Con frecuencia los pacientes refieren manifestaciones inespecíficas y secundarias a la afectación por la hipercalcemia de un gran número de sistemas (Tabla 1). En algunos se presenta como crisis aguda, caracterizada por alteraciones mentales graves, insuficiencia renal aguda y síntomas digestivos, que llevan al fracaso renal oligúrico, coma y muerte en taquiarritmia o fracaso ventricular.

<b>Neuromusculares y psiquiátricas</b>	<b>Renales</b>	<b>Gastrointestinales</b>	<b>Cardiovasculares</b>
<b>Astenia</b>	Poliuria, polidipsia	Anorexia, náuseas	Hipertensión
<b>Confusión, letargia, coma</b>	Nefrocalcinosis	Estreñimiento	Arritmias
<b>Somnolencia</b>	Nefrolitiasis	Úlcera péptica	Cambios electrocardiográficos
<b>Irritabilidad, depresión</b>	Insuficiencia renal	Pancreatitis	Sinergismos con digoxina

**Tabla 1.** Manifestaciones clínicas de hipercalcemia.

La asociación de hipercalcemia crónica con las manifestaciones clínicas óseas o renales típicas es virtualmente diagnóstica de hiperparatiroidismo primario. Pero en la actualidad muchos pacientes presentan una hipercalcemia ligera totalmente asintomática o con síntomas inespecíficos, que se detecta casualmente al hacer un perfil bioquímico general, de manera que el problema que se plantea entonces es el del diagnóstico diferencial de la hipercalcemia. El hiperparatiroidismo primario se suele encontrar en pacientes ambulatorios con hipercalcemia ligera estable durante años. La hipovitaminosis D puede enmascarar la presencia de la enfermedad,

produciendo normocalcemia asociada a signos radiológicos de hiperparatiroidismo. Al corregir la deficiencia de vitamina D aparece la hipercalcemia <sup>(1, 2, 4)</sup>.

Generalmente, cuando se palpa un nódulo en el cuello en un paciente con hiperparatiroidismo primario suele deberse a una enfermedad tiroidea coincidente, más que al proceso paratiroideo.

En el hiperparatiroidismo primario las concentraciones plasmáticas de fosfato y magnesio están dentro de los respectivos intervalos de referencia o ligeramente por debajo de éstos. Los marcadores de remodelación ósea suelen estar elevados en los casos de franca afectación ósea, con cambios marginales en el resto de los casos, pero estas alteraciones son inespecíficas. Las concentraciones plasmáticas de 25-(OH)-vitamina D<sub>3</sub> suelen estar dentro del intervalo de referencia o ligeramente por debajo de éste (la PTH acelera su metabolismo).

En orina, los valores de caudal (concentración/volumen) de la excreción de calcio se encuentran cercanos al límite superior del intervalo de referencia o bien por encima de éste o claramente superiores, y los valores de caudal de la excreción de fosfato pueden estar por encima del valor de referencia <sup>(1, 2, 4)</sup>.

El diagnóstico definitivo del hiperparatiroidismo primario se establece mediante la demostración de una hipercalcemia asociada a concentraciones plasmáticas de PTH por encima del intervalo de referencia.

En la actualidad se dispone de diversos procedimientos de medida que permiten medir las concentraciones plasmáticas de paratirina evitando la interferencia de metabolitos biológicamente inactivos (PTH 1 – 84 o intacta y recientemente la PTH 1 – 34 o Bio). Una hipercalcemia con unas concentraciones de PTH, medidas con uno de los procedimientos antes expuestos, por encima del límite superior de referencia es característica del hiperparatiroidismo primario. Sin embargo, en casos aislados,

las concentraciones de PTH están dentro del intervalo de referencia, pero debe considerarse que en realidad esa PTH no está adecuadamente suprimida por la hipercalcemia (debería ser muy baja si las paratiroides funcionaran normalmente).

La displasia fibrosa poliostótica puede confundirse radiológicamente con una osteítis fibrosa quística, pero no va acompañada de hipercalcemia, ni de concentraciones plasmáticas de PTH elevadas. La condrodistrofia de Jansen se debe a una mutación activadora del receptor tipo 1 de la PTH, se hereda con carácter autosómico dominante, afecta a niños y se caracteriza por extremidades cortas, hipercalcemia ligera y concentraciones de PTH disminuidas <sup>(1, 2, 4)</sup>.

Si el diagnóstico del hiperparatiroidismo ha sido establecido, el tratamiento de elección es la exploración quirúrgica y extirpación de las glándulas paratiroides enfermas.

El éxito de la cirugía de paratiroides (paratiroidectomía) se basa en algunos factores como el conocimiento de las condiciones patológicas, seguridad en la localización de glándula paratiroidea normal y anormal, y la experiencia del cirujano realizando una meticulosa disección durante la exploración de las glándulas anormales. Aunque el método de obtención del diagnóstico inicial y el tipo de tratamiento de estas condiciones están bien definidos y establecidos en la literatura médica, existe una considerable controversia sobre el uso de estudios preoperatorios para localizar tejido paratiroideo anormal previo a una exploración primaria del cuello <sup>(5)</sup>. Dado que el grado de éxito de la exploración quirúrgica primaria del cuello, en pacientes que presentan hiperparatiroidismo primario, puede exceder del 90 % en manos experimentadas, algunos autores han cuestionado el papel de los estudios de localización preoperatoria en estos casos <sup>(6, 7)</sup>.

La mayoría de los autores está de acuerdo en que los estudios de localización deben ser usados antes de la paratiroidectomía en pacientes que han sido sometidos a una cirugía tiroidea extensa en el pasado o por recurrencia o persistencia del hiperparatiroidismo <sup>(8, 9, 10)</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los cirujanos sugieren que no es necesario realizar estudios de localización cuando se opera a un paciente sin historia de cirugía previa <sup>(11)</sup>. Este argumento se basa en el hecho de que los procedimientos comunes de localización presentan un (75 – 80) % de seguridad cuando son realizados por especialistas experimentados y modernos equipos de imagen <sup>(12, 13)</sup>.

### **1.2 FISIOPATOLOGÍA DEL HUESO**

El tejido óseo sufre un continuo intercambio, en condiciones normales en equilibrio, entre formación ósea y resorción ósea. Este proceso se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de osteoblastos y osteoclastos sobre una misma superficie ósea <sup>(14)</sup>. En cada ciclo de remodelado, las células que recubren la superficie ósea son reemplazadas por osteoclastos, que durante un período de dos semanas “excavan” una laguna o cavidad en el tejido óseo <sup>(15)</sup> (resorción ósea). Posteriormente, los osteoclastos son reemplazados por osteoblastos que depositan matriz ósea y gradualmente “rellenan” el espacio reabsorbido (formación ósea). El impacto de este proceso a nivel tisular viene determinado por el número de unidades de remodelado (UR) en el esqueleto y por el balance final de cada ciclo, es decir, por la diferencia entre la cantidad de tejido reabsorbido y formado en cada unidad. Cuando hay un incremento absoluto o relativo de la resorción frente a la formación se produce una pérdida de masa ósea. Ello puede ser debido a un aumento de la resorción a consecuencia de que los osteoclastos “excavan” cavidades muy profundas que los

osteoblastos son incapaces de restaurar (recambio óseo alto), o bien por un déficit en la formación, al producir los osteoclastos cavidades normales o incluso de menor profundidad pero que los osteoblastos no pueden “rellenar” (recambio óseo bajo). Este remodelado es necesario para mantener la integridad estructural del esqueleto y ayudar a su función metabólica como almacén de calcio y fosfato, estando altamente regulado tanto por factores sistémicos como locales.

### 1.2.1 Factores sistémicos

Los principales moduladores sistémicos son la paratirina, vitamina D y, en menor medida, la calcitonina. Otros factores que también intervienen son las hormonas gonadales, las hormonas tiroideas, los glucocorticoides y la somatotropina (hormona del crecimiento).

Las hormonas gonadales o sexuales desempeñan un importante papel tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la masa ósea. Tradicionalmente se ha considerado que el papel de los estrógenos y la testosterona era específico del sexo, aunque en la actualidad se conoce que ambos tipos de hormonas desempeñan acciones en el hueso ya que las células expresan receptores para estrógenos y testosterona independientemente del sexo <sup>(16)</sup>. Las hormonas gonadales ejercen un efecto positivo sobre la masa ósea ya que inhiben la resorción ósea y estimulan la formación ósea. El efecto antirresortivo de los estrógenos es más potente, y aunque ambos estimulan la formación ósea, la testosterona influye fundamentalmente sobre osteoblastos maduros y osteocitos mientras que los estrógenos regulan la actividad osteoblástica en distintas fases de su desarrollo <sup>(17)</sup>.

### 1.2.2 Factores locales

La estructura y el remodelado óseo están determinados por estímulos locales que actúan sobre las células del tejido óseo directamente y como mediadores de las hormonas sistémicas. Se han identificado diversos factores reguladores locales, como citocinas, interleucinas (IL), factores de crecimiento, prostaglandinas (PG) y óxido nítrico, producidos por la médula ósea adyacente o bien por las propias células del hueso. Los datos en humanos son limitados, basándose en estudios sobre cultivos de médula ósea de mujeres estrógeno-deficientes en los que se ha identificado un aumento significativo de IL-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6 y PG. Las PG son potentes reguladores de la función de la célula ósea, particularmente la PGE<sub>2</sub> <sup>(18)</sup>, actuando tanto en la resorción como en la formación ósea. La síntesis excesiva de PG se traduce en un aumento de la resorción ósea, mientras que la producción deficiente altera la función formativa de las células óseas y su respuesta ante los estímulos mecánicos y la remodelación.

### 1.2.3 Sistema OPG/RANKL

En los últimos años, se han realizado grandes avances en el conocimiento del mecanismo molecular de la regulación del remodelado óseo, especialmente sobre la relación existente entre los osteoblastos y los osteoclastos. La osteoprotegerina (OPG) es una proteína con una potente actividad inhibitoria de la osteoclastogénesis <sup>(19)</sup> y tiene una acción antagónica a otra proteína producida por los osteoblastos llamada ligando del receptor de factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) que debe unirse al receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANK) para activarse. La interacción entre RANK y RANKL estimula la actividad resortiva de los osteoclastos e inhibe su apoptosis <sup>(20)</sup>. La OPG neutraliza tanto al RANKL soluble como a su forma unida a la

célula <sup>(21)</sup>, inhibiendo la diferenciación de los precursores de los osteoclastos e induciendo su apoptosis.

Así, el RANKL (factor de diferenciación osteoclástica) y la OPG (factor inhibidor de la osteoclastogénesis), ambos expresados en los osteoblastos, actúan sobre la osteoclastogénesis que precede a la fase de resorción ósea: mientras el primero es un fuerte estímulo del proceso, el segundo es su principal inhibidor. La OPG actúa como “receptor señuelo” del primero, evitando su unión al RANK.

Todo ello sugiere que la osteoclastogénesis requiere un balance entre la producción de RANKL y su antagonista la OPG <sup>(22)</sup>, y en cuya regulación intervienen diversos factores como hormonas, citocinas y PG.

Como factores estimuladores e inhibidores del RANKL se encuentran <sup>(23 – 26)</sup>:

<b>Factores estimuladores</b>	<b>Factores inhibidores</b>
IL-1, IL-6 e IL-11	Péptido vasoactivo intestinal (VIP)
Oncostatina	17-β-estradiol
TNG-α	
PGE <sub>2</sub>	
Dexametasona	
PTH	
Inmunosupresores como:	
• Ciclosporina A, tacrolimus	
• Sirolimus, everolimus	

Como factores estimuladores e inhibidores de la OPG se encuentran <sup>(26 – 28)</sup>:



Factores estimuladores	Factores inhibidores
IL-1	PGE <sub>2</sub>
1,25-(OH) <sub>2</sub> -vitamina D <sub>3</sub>	PTH
TNG-α	Glucocorticoides
17-β-estradiol	Inmunosupresores como:
Péptido vasoactivo intestinal (VIP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclosporina A, tacrolimus</li> <li>• Sirolimus, everolimus</li> </ul>

### 1.2.4 Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son moléculas liberadas al torrente sanguíneo durante los procesos de formación o resorción ósea, que reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento determinado. Además, nos informan sobre la tasa de pérdida de tejido óseo pudiendo ser útiles para determinar el riesgo de fracturas futuras. En el proceso de resorción ósea se origina la liberación del contenido mineral y de la degradación de la matriz proteica y, en cambio, en la síntesis y mineralización del tejido óseo se liberan moléculas enzimáticas y fragmentos derivados del procesamiento del colágeno que son vertidos al torrente sanguíneo y pueden ser medidos como índices de remodelado óseo.

Los principales marcadores de formación ósea son:

- Fosfatasa alcalina.
- Fosfatasa alcalina ósea.
- Propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo I (P1NP).
- Propéptido carboxiterminal del procolágeno de tipo I (P1CP).

Los principales marcadores de resorción ósea son:

- Hidroxiprolina.
- Piridinolina y deoxipiridinolina.
- Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP).
- C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I (CTX).
- N-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I (NTx).

El principal marcador de remodelado óseo es:

- Osteocalcina (OC).

En este estudio se ha planteado emplear sólo un marcador de cada proceso del hueso (formación, resorción y remodelado), siendo éstos los que se presentan a continuación.

### 1.2.4.1 Fosfatasa alcalina (ALP)

Los osteoblastos producen gran cantidad de fosfatasa alcalina cuando el proceso de desarrollo de la matriz ósea es activo. La fosfatasa alcalina aumenta la concentración de fosfato inorgánico y activa las fibras de colágeno para que puedan contribuir a la precipitación de sales de calcio. También estimula la mineralización al hidrolizar el pirofosfato inorgánico, un potente inhibidor de la formación y disolución de hidroxiapatita <sup>(29)</sup>, en el interior de las vesículas de la matriz calcificante extracelular.

Existen 4 isoenzimas de fosfatasa alcalina: placentaria, intestinal, de células germinales y hepática/hueso/riñón codificadas a partir de tres genes distintos <sup>(30)</sup>. La isoenzima de fosfatasa alcalina encontrada en el hígado, huesos y riñones es el principal componente de esta enzima en el suero.

En pacientes con osteoporosis pueden producirse incrementos ligeros en la actividad de fosfatasa alcalina debido a varias razones:

- El aumento en el remodelado óseo que ocurre inmediatamente después de la menopausia incrementa las concentraciones catalíticas de fosfatasa alcalina aproximadamente 2 veces.
- Enfermedades que causan osteoporosis como el hiperparatiroidismo y la tirotoxicosis pueden elevar las concentraciones de fosfatasa alcalina.
- La presencia de fracturas u otras alteraciones localizadas del metabolismo óseo también pueden elevar las concentraciones de fosfatasa alcalina.

Las concentraciones catalíticas de fosfatasa alcalina en pacientes con osteoporosis generalmente alcanzan 2 veces el límite superior del intervalo de referencia. Elevaciones mayores a estas concentraciones sugieren que puede tratarse de una enfermedad ósea diferente a la osteoporosis. Algunas enfermedades que pueden producir concentraciones muy elevadas de fosfatasa alcalina son la enfermedad de Paget y la osteomalacia, así como aumentos de fosfatasa alcalina proveniente de fuentes no esqueléticas como es el caso de varias enfermedades hepáticas <sup>(31)</sup>.

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

La osteocalcina es una proteína característica del hueso. Es la proteína no colágena más abundante en la matriz ósea. La osteocalcina regula la homeostasis del calcio inhibiendo la precipitación de fosfato y calcio evitando la excesiva mineralización de la matriz ósea, posiblemente, a través de la unión de la osteocalcina con el núcleo inicial de hidroxapatita <sup>(32)</sup>. También presenta actividad quimiotáctica en los monocitos y macrófagos, motivo por el cuál, podría ser la responsable de atraer células a las superficies endoteliales durante el remodelado óseo <sup>(33, 34)</sup>.

La osteocalcina es producida por el osteoblasto. Después de su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso; sin embargo, una fracción es liberada a la circulación donde puede ser medida.

La concentración sérica de osteocalcina se incrementa en condiciones asociadas con aumento del remodelado óseo, como en el hiperparatiroidismo primario o secundario y en la enfermedad de Paget. Las concentraciones séricas de osteocalcina, generalmente, son un buen indicador del ritmo de remodelado óseo cuando la resorción y la formación se encuentran acopladas. En casos como la osteoporosis postmenopáusica, donde la resorción y la formación se encuentran desacopladas, su valor semiológico está relacionado con el proceso de formación ósea <sup>(31)</sup>.

### **1.2.4.3 C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I (CTX)**

Los telopéptidos carboxiterminales son fragmentos liberados de colágeno degradado durante la actividad de los osteoclastos y son marcadores específicos de la pérdida de colágeno óseo. Por ello, sus concentraciones en suero son indicadoras de la resorción ósea. Estas concentraciones aumentan en pacientes con enfermedades óseas asociadas con aumento en la resorción (hipertiroidismo primario y secundario, osteoporosis posmenopáusica) y disminuyen en pacientes con osteoporosis en respuesta a tratamiento antirresortivo o tras cirugía paratiroidea <sup>(31)</sup>.

### **1.2.5 Osteopenia y osteoporosis**

La osteopenia puede definirse como una enfermedad metabólica ósea crónica o aguda y progresiva caracterizada por una resistencia disminuida de los huesos sin una predisposición previa a padecer fracturas (denominada, vulgarmente, osteoporosis sin fractura) <sup>(35)</sup>. La osteopenia se considera un paso previo a la

osteoporosis. La existencia de osteoporosis indica la presencia de osteopenia, pero no al revés <sup>(1)</sup>.

La resistencia ósea refleja la integración de la densidad ósea (determinada por el pico de masa ósea y por la cantidad de pérdida de masa ósea expresada como gramos de mineral por área o volumen) y la calidad ósea (caracterizada por la arquitectura, recambio, acúmulo de lesiones y mineralización).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los siguientes criterios basados en la medición de los índices T (T-Score) y su desviación con respecto a la normalidad en mujeres adultas de raza blanca <sup>(36)</sup>:

- Una DMO entre  $\pm 1$  desviación estándar (DE) de la media de la población adulta joven (T-Score), se considera normal.
- Una DMO entre -1 y -2,5 DE de la media de la población adulta joven (T-Score), se considera osteopenia.
- Una DMO por debajo de -2,5 DE de la media de la población adulta joven (T-Score), se considera osteoporosis.
- Una DMO por debajo de -2,5 DE de la media de la población adulta joven (T-Score) y una o más fracturas de tipo osteoporótico, se considera osteoporosis grave.

El T-Score se define como la diferencia, en número de DE, existente entre el valor de masa ósea de un paciente determinado respecto al valor medio de masa ósea de una población adulta joven, o sea, supone la comparación de la medición de la masa ósea obtenida respecto al valor medio máximo que se alcanza en el momento de mayor madurez del esqueleto (pico de masa ósea). El T-Score = (DMO medida – DMO media a los 30 años) / desviación estándar de la DMO a los 30 años.

En la osteoporosis, la actividad osteoclástica (destrucción del hueso producido por los osteoclastos) aumenta, o bien disminuye la actividad osteoblástica (formación de hueso llevado a cabo por los osteoblastos).

Estudios epidemiológicos han identificado un conjunto de factores de riesgo para la osteoporosis <sup>(37)</sup>, pudiéndose clasificar según:

1. Edad (la osteoporosis es más frecuente en el último tercio de la vida).
2. Factores genéticos: sexo (la osteoporosis es más frecuente en la mujer); raza (es más propensa la raza blanca que la negra), carácter familiar (mayor incidencia en hijas de madres osteoporóticas), enfermedades hereditarias (osteogénesis imperfecta); constitución (delgadez).
3. Factores hormonales: tiempo de exposición a las hormonas sexuales (la incidencia de osteoporosis es mayor si la menopausia es precoz, la menarquía es tardía, existen fluctuaciones amenorreicas o hay hipogonadismo), hipertirodismo; hiperparatiroidismo, hipercortisolismo, diabetes tipo 1.
4. Factores higiénico-dietéticos y estilo de vida: aporte de calcio y vitamina D; estado nutritivo (las personas de complexión delgada son más propensas a la osteoporosis, debido a que el tejido adiposo es fuente de estrógenos, y porque el peso supone un estímulo mecánico para el esqueleto); ejercicio físico (la sobrecarga mecánica favorece la formación ósea e inhibe la resorción); tabaco y alcohol (efectos negativos).
5. Enfermedades no endocrinológicas: malabsorción, hepatopatías, enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide), mieloma.
6. Factores farmacológicos: corticoides, citostáticos, anticonvulsivantes, heparina.

La osteoporosis puede clasificarse en dos grandes tipos: osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria. El segundo término se utiliza cuando el principal factor determinante de la osteoporosis es un factor esporádico (Tabla 2). El primer término se utiliza para englobar tres situaciones: la osteoporosis fundamentalmente debida al envejecimiento (osteoporosis senil), la osteoporosis fundamentalmente debida a la menopausia (osteoporosis postmenopáusica), y la osteoporosis para la que, dándose antes de la menopausia en la mujer y de los 65 años en el hombre, no se encuentra ninguna explicación (osteoporosis idiopática). El conjunto de osteoporosis senil y postmenopáusica con frecuencia se califica de involutiva. En la osteoporosis postmenopáusica y en la idiopática, la fractura más característica es la vertebral. En la senil son más características las fracturas de las extremidades (con la excepción de la fractura de muñeca, que es también frecuente en la postmenopausia), especialmente la de cadera.

<b>Procesos inflamatorios</b>	<b>Hipogonadismo</b>	<b>Malabsorción</b>	<b>Enfermedades endocrinas</b>
<b>Artritis reumatoide</b>	Amenorrea de los deportistas	Celiaquía	Hipertiroidismo
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal</b>	Hemocromatosis	Postgastrectomía	<b>HIPERPARATIROIDISMO</b>
	Síndrome de Turner	Enfermedades colestáticas	
	Síndrome de Klinefelter		
	Hipopituitarismo		

**Tabla 2.** Ejemplos de osteoporosis secundaria.

### **1.3 GENÉTICA DEL HUESO**

Algunos aspectos de la osteopenia y la osteoporosis tienen un fuerte componente genético, puesto de manifiesto en los estudios epidemiológicos que revelan que la presencia de antecedentes maternos de fractura se relaciona con un mayor riesgo de fractura en las hijas <sup>(38)</sup>. Sin embargo, la evidencia más clara deriva de los estudios de la densidad mineral ósea (DMO) en gemelos <sup>(39 - 44)</sup>. La heredabilidad de la DMO es elevada; se ha estimado en un (50 - 80) %. De manera que, aunque los estudios en gemelos pueden sobrevalorar la heredabilidad, parece claro que una parte considerable de la variación de los valores de la DMO puede explicarse por factores genéticos, mientras que el resto se explicarían mediante factores ambientales. Ello implica que deben existir “genes de DMO”, cuyas variaciones determinarían las diferencias interindividuales en la DMO, que pueden manifestarse de formas diversas; por ejemplo, como diferencias en el pico de masa ósea alcanzado tras completar el período de crecimiento, o como diferencias en la velocidad de pérdida de masa ósea con la edad.

Diferentes estudios <sup>(45-48)</sup> apuntan que algunos factores ambientales pueden modificar notablemente el efecto de los factores genéticos sobre el hueso. Entre ellos cabe pensar, por ejemplo, en la dieta, el ejercicio y la exposición al sol.

Mientras que los factores genéticos permanecen constantes a lo largo de la vida, los factores ambientales tienden a cambiar, lo que puede producir diferentes “niveles de expresión” de la susceptibilidad genética. Así, el envejecimiento va asociado con un deterioro del estado funcional debido a una menor actividad física, a una menor exposición solar, a cambios en la dieta, etc. Este hecho, puede provocar que algunas susceptibilidades genéticas se manifiesten sólo en etapas avanzadas de la vida.



No es de extrañar, pues, que la osteoporosis sea considerada como un rasgo genético “complejo”. Esa complejidad es compartida por otros procesos frecuentes que tienen un cierto componente genético y que a menudo están relacionados con la edad, la diabetes, la esquizofrenia, la artrosis o el cáncer.

“Complejo” significa que el proceso es multifactorial y multigénico. Así, los factores de riesgo de tipo genético (esto es, ciertos alelos o variantes génicas) serán transmitidos de generación en generación, pero su expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes y con factores ambientales.

Es conocido que existen múltiples variaciones alélicas para un gen determinado en una población (polimorfismo). Estos polimorfismos pueden ser de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism, SNP) o del tipo de inserción-delección (I/D), principalmente.

Para su análisis, pueden estudiarse aquellas variantes que presenten una repercusión funcional, por suponer cambios en los codones o en los niveles de expresión. Dado el tamaño medio de los genes y la relativa juventud de las poblaciones humanas, se puede predecir que en cada población estudiada pueden coexistir varios polimorfismos “relevantes”. Sin embargo, a pesar de esas dificultades, la investigación genética ha de contribuir a una mejor comprensión de las enfermedades complejas. La identificación de nuevos genes o bien el conocimiento de nuevas funciones de genes ya conocidos, puede permitir profundizar en los mecanismos de la enfermedad y ayudar a diseñar estrategias terapéuticas. Finalmente, el estudio de las variantes génicas asociadas a las diferencias fenotípicas podría, junto a la consideración de otros factores conocidos, contribuir a la predicción del riesgo de osteoporosis.

Aunque la traslación a la clínica de los resultados de los estudios sobre la genética de la osteoporosis aún está en sus fases iniciales, es de esperar su aplicación en dos áreas principales:

- Predicción de la respuesta al tratamiento. Algunos polimorfismos, como los relacionados con las enzimas que metabolizan los fármacos, pueden determinar la eficacia de éstos. Los análisis genotípicos pueden identificar a los sujetos en los que es de esperar una mejor respuesta y excluir aquéllos más proclives a sufrir efectos secundarios (farmacogenómica).
- Identificación de sujetos en riesgo. Como ilustran los estudios sobre el COL1A1, los individuos con alelos de riesgo son más proclives a desarrollar osteoporosis. Los análisis genéticos pueden permitir instaurar medidas preventivas individualizadas precozmente.

### 1.3.1 Genes y polimorfismos candidatos

Hasta el momento, sólo un polimorfismo, el *g.1252G>T (Sp1)* del gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I (COL1A1) está considerado como un factor de riesgo directo de osteoporosis. Sin embargo, su utilización debe considerarse con precaución. Ello subraya la necesidad de seguir identificando otros genes relacionados con el riesgo de osteoporosis, a fin de poder precisar cómo los diversos marcadores influyen en el fenotipo final.

Otros polimorfismos de genes candidatos implicados con variaciones de la densidad mineral ósea y por consiguiente con la osteopenia y la osteoporosis son: los polimorfismos *g.59978C>A (Apa I)*, *g.58980G>A (Bsm I)*, *c.162G>A (Fok I)* y *c.1216T>C (Taq I)* del gen del receptor de la vitamina D (VDR), *c.677C>T (C677T)* y *c.1298A>C (A1298C)* del gen de la metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) y el

polimorfismo *c.1516C>T (Alu I)* del gen del receptor de la calcitonina (CTR) <sup>(49, 50)</sup>. En la mayoría de los casos, los mecanismos por los cuales estos polimorfismos pueden influir en las alteraciones óseas se desconocen, o bien existen discrepancias entre las teorías expuestas.

### **1.3.1.1 Gen del receptor de la vitamina D (VDR)**

El gen VDR contiene la información codificada necesaria para la síntesis del receptor de vitamina D. Las acciones biológicas de la vitamina D y sus metabolitos se llevan a cabo por medio del receptor de la vitamina D (VDR). Los VDR se distribuyen ampliamente y no se encuentran restringidos en tejidos diana clásicos de la vitamina D, lo que justifica la variedad de acciones de la 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vit D en el organismo. Los VDR se encuentran en tejidos implicados en la homeostasis del calcio, como intestino, paratiroides y riñón. Se localizan también en los osteoblastos, donde la 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vit D promueve su diferenciación y regula la producción de proteínas tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina. También induce en las membranas celulares, el RANKL. De esa manera, la 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vit D regula tanto la formación como la resorción ósea. También existen receptores en otros tejidos, como epidermis, músculo, páncreas, órganos reproductores y sistema hematopoyético <sup>(51, 52)</sup>.

El VDR, después de unirse a la 1,25(OH)<sub>2</sub> Vit D, se heterodimeriza con otros receptores hormonales, en particular con la familia de los receptores retinoides X (RXR). Este complejo se liga a secuencias de DNA, llamadas elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), en las regiones promotoras de los genes que regula. Los heterodímeros VDR/RXR activados forman complejos con unas proteínas adicionales llamadas coactivadoras, para formar un puente con el complejo VDR/RXR que une los VDRE a las proteínas responsables de la

transcripción, como la RNA polimerasa II en el lugar de comienzo de la transcripción (51, 52).

En las glándulas paratiroides el control de la transcripción del gen de la paratirina (PTH) está mediado por el VDR, que inhibe la expresión del RNA mensajero (mRNA) de la PTH (51).

El gen VDR está localizado en el cromosoma 12 en la región 12q13.1, consta aproximadamente de 63,5 kb y presenta 11 exones y 10 intrones (53, 54, 55). En el intrón 8 se encuentran dos SNP que modifican sendas dianas de restricción de las enzimas *Bsm I* y *Apa I* (por lo que clásicamente se han denominado así). Además, una mutación silenciosa en el codón 352, ubicada en el exón 9, da lugar a una alteración en la diana de restricción de la enzima *Taq I*, definiéndose así el polimorfismo *Taq I*. (49, 53).

Los polimorfismos *Bsm I*, *Apa I* y *Taq I* no parecen influir en un cambio conformacional de la proteína, pero se ha demostrado que su existencia puede provocar un cambio en la transcripción de la zona codificante del gen o bien modificar la estabilidad del mRNA (49, 53, 54).

Un polimorfismo del exón 2, ubicado en uno de los dos sitios de inicio de la traducción de la proteína, modifica una diana de restricción de la enzima *Fok I* (de la que el SNP toma su denominación clásica). La variante alélica **f** da lugar a una proteína de 427 aminoácidos (isoforma M1), mientras que la variante alélica **F** da lugar a una proteína con tres aminoácidos menos (424 aminoácidos) como consecuencia del cambio del codón de inicio (isoforma M4), provocando un cambio en la estructura primaria de la proteína que podría alterar la funcionalidad de la proteína traducida. Diversos estudios apuntan que la isoforma M4 parece presentar

una mayor actividad, en determinados órganos y células) que la isoforma M1, aunque existe una gran controversia al respecto <sup>(53)</sup>.

Los polimorfismos *Bsm I*, *Taq I* y *Apa I*, y en especial los dos primeros, constituyen una agrupación (“cluster”). El acoplamiento de las variantes alélicas **b** (del *Bsm I*), **a** (del *Apa I*) y **T** (de *Taq I*), junto con la variante alélica **F** del polimorfismo *Fok I*, podrían constituir una “protección” ante la osteoporosis <sup>(49, 53)</sup>.

### 1.3.1.2 Gen del receptor de calcitonina (CTR)

El gen CTR contiene la información codificada necesaria para la síntesis del receptor de calcitonina. La calcitonina ejerce su acción uniéndose a receptores específicos de membrana. Todos los receptores de calcitonina pertenecen a una familia de receptores, con siete dominios transmembrana y una larga secuencia extracelular, en que existen seis residuos de cisteína y dos puntos de glicosilación. Estas estructuras están muy conservadas y parecen muy importantes para la unión de la molécula de calcitonina. Una vez que la calcitonina se une a su receptor, ésta ejerce su acción sobre la célula a través de la proteína G-adenilciclase-AMPC y de la fosfolipasa C-trifosfato de inositol <sup>(52)</sup>.

La gran riqueza de CTR en el osteoclasto explica que se incremente, en esta célula, la acción biológica fundamental de la calcitonina: actúa como un potente inhibidor de la actividad osteoclástica y, por consiguiente, la resorción ósea disminuye <sup>(52)</sup>.

Existe evidencia de que la calcitonina inhibe la expresión del receptor a nivel transcripcional, mientras que los glucocorticoides la estimulan. Recientemente, se ha sugerido que el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el NF-KB también regulan la expresión y la función del receptor.

Además del osteoclasto, se han detectado receptores de calcitonina en el riñón, sistema nervioso central, determinadas poblaciones de linfocitos B, espermatozoides, células tumorales y condrocitos <sup>(52)</sup>.

El gen está localizado en el cromosoma 7, en la región 7q21.3, consta aproximadamente de 150 kb y presenta 13 exones <sup>(55)</sup>. Existe un polimorfismo consistente en la sustitución de una timina (T) por una citosina (C), que altera una diana de restricción de la enzima *Alu I* (de la que el SNP toma su denominación clásica). Este hecho, provoca el cambio de una leucina (CTG) por una prolina (CCG) en la posición 447 de la proteína. Esta sustitución de aminoácidos induce un cambio conformacional de la proteína en el tercer dominio intracelular carboxi-terminal de la proteína y por consiguiente, en la funcionalidad de la misma <sup>(49, 58, 59)</sup>.

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

El gen COL1A1 contiene la información codificada necesaria para la síntesis de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I. El colágeno tipo I es una proteína presente en todos los tejidos de sostén, especialmente en el hueso (donde el colágeno tipo I es el principal componente de la matriz orgánica), piel y tendones, pero también en ligamentos, córnea, dentina y vasos sanguíneos. Las consecuencias de la alteración de este colágeno en el hueso son la disminución de la matriz ósea, con alteración de la estructura ósea y mala mineralización (osteopenia), de forma que la resorción ósea predomina sobre la formación de hueso nuevo. Esto supone la presencia de fragilidad ósea, fracturas frecuentes, deformidades óseas y talla baja <sup>(1, 2)</sup>.

El gen COL1A1 está localizado en el cromosoma 17, en la región 17q21.31-q22.15, consta de aproximadamente 18 kb y presenta 51 exones <sup>(55)</sup>. Uno de los polimorfismos más ampliamente estudiados de este gen es el denominado *Sp1*, consistente en la sustitución de una guanina (G) por una timina (T) en la primera

base del primer intrón del gen. Pese a que este polimorfismo no influye en un cambio conformacional de la proteína, al no estar ubicado en una zona codificante, esta sustitución afecta al centro de unión del factor de transcripción *Sp1* (Splicing 1) y por consiguiente, en la regulación de la transcripción del gen. Diferentes estudios afirman que los individuos que presentan el alelo *s* (es decir, timina) tienen una elevada afinidad por la proteína *Sp1*, lo que se asocia a una elevada transcripción alelo-específica. Estas variaciones se acompañan con un aumento en la producción de la cadena alfa 1 del colágeno. Pese a este hecho, la influencia de este cambio concreto en la regulación del gen y en la producción de la proteína no se conocen con claridad <sup>(49, 50, 59, 60)</sup>.

### **1.3.1.4 Gen de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR)**

El gen MTHFR contiene la información codificada necesaria para la síntesis de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR). La MTHFR (EC 1.5.1.20) <sup>(3)</sup> cataliza el paso de 5-metiltetrahidrofolato, en presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , a 5,10-metilentetrahidrofolato. Participa en el proceso de remetilación de la homocisteína, un aminoácido sulfurado proveniente de la desmetilación de la metionina, que permite mantener unas concentraciones fisiológicas de homocisteína <sup>(1, 2)</sup>.

El gen MTHFR está localizado en el cromosoma 1 en la región 1p36.3, consta aproximadamente de 13 kb y presenta 11 exones <sup>(55)</sup>. Existen diversos polimorfismos del gen MTHFR: el más estudiado es el *C677T*, que implica la sustitución de una citosina (C) por una timina (T) en el codón 677 que provoca el cambio de una alanina por una valina. Esta sustitución de aminoácidos, induce un cambio conformacional de la proteína y por consiguiente, en la funcionalidad de la misma: disminuye la actividad enzimática de la enzima debido a un aumento de la termolabilidad, provocando un aumento de las concentraciones plasmáticas de

homocisteína <sup>(49, 50, 61, 62)</sup>. Por otro lado, el polimorfismo *A1298C*, que implica el cambio de glutamato por alanina como consecuencia de la sustitución de una adenosina (A) por una citosina (C) no parece estar asociado por sí solo, con la variación de la concentración de homocisteína.



## **2. JUSTIFICACIÓN**

## 2 JUSTIFICACIÓN

El hiperparatiroidismo primario es una enfermedad cuya prevalencia oscila entre el 1 y el 3 ‰ en la población adulta. Su incidencia anual es de 250 nuevos casos por millón de habitantes y año. Afecta sobre todo a adultos (el 85 % de los casos tienen más de 30 años), siendo mayor su frecuencia en la séptima década y en mujeres postmenopáusicas. Es dos veces más frecuente en las mujeres que en los varones (1).

Es conocido que no tratar el hiperparatiroidismo primario puede provocar, con el tiempo, enfermedades como la osteopenia y osteoporosis, entre otras. Por ello, siempre que es factible y se cumplen una serie de requisitos, el tratamiento de elección para erradicar esta enfermedad es la paratiroidectomía.

Para valorar la respuesta al tratamiento y la evolución de esta enfermedad, podría ser útil estudiar diversas magnitudes biológicas relacionadas con el hueso y la realización de densitometrías óseas, antes y después de la paratiroidectomía, así como llevar a cabo estudios de asociación de diversos polimorfismos genéticos relacionados con el hueso.

Algunos de los polimorfismos genéticos comentados en la introducción han sido asociados con la pérdida de masa ósea, con diversas magnitudes biológicas relacionadas con el hueso (marcadores de formación, de resorción y de remodelado óseo) y por consiguiente con la osteopenia y la osteoporosis, pero sólo algunos de estos polimorfismos genéticos han sido relacionado directamente o indirectamente con el hiperparatiroidismo primario.

### **3. OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis han sido estudiar, en pacientes diagnosticados de hiperparatiroidismo primario y que fueron sometidos a cirugía paratiroidea:

1. la evolución de las concentraciones de diversas magnitudes biológicas relacionadas con el hueso: el día después de una cirugía paratiroidea y a los 3, 6 y (12 – 18) meses posteriores a la intervención quirúrgica, así como la evolución de la densidad mineral ósea a los (12 – 18) meses posteriores a la cirugía;
2. la relación entre los cambios en la densidad mineral ósea y las concentraciones de diversos marcadores óseos al igual que con los cambios de éstos, en los mismos momentos indicados anteriormente;
3. la asociación de diversos polimorfismos genéticos relacionados con el hueso con los cambios en la densidad mineral ósea y las concentraciones de diferentes marcadores óseos y con los cambios de ambos.
4. la influencia sobre las concentraciones de diversos marcadores óseos y la densidad mineral ósea de distintas combinaciones de genotipos de los mencionados polimorfismos.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 POBLACIÓN ESTUDIADA

Para la realización de este estudio se incluyeron, desde febrero del 2001 hasta junio del 2006, 86 pacientes (20 hombres y 66 mujeres) diagnosticados de hiperparatiroidismo primario (HPTP) en el Hospital Universitari de Bellvitge que fueron sometidos a cirugía paratiroidea. De éstos, 79 presentaron como origen de la enfermedad un adenoma paratiroideo (91,7 %) y 7 presentaron una hiperplasia de alguna de las glándulas paratiroides (8,3 %).

Once pacientes (8 mujeres y 3 hombres) fueron excluidos del estudio por presentar alguna de las siguientes situaciones:

- Inmovilización prolongada.
- Enfermedad endocrinológica (excepto hiperparatiroidismo primario): síndrome de Cushing, hipogonadismo, hipopituitarismo, tumores hipofisarios.
- Enfermedad hereditaria: osteogénesis imperfecta, síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, neoplasia endocrina múltiple (MEN).
- Cáncer.
- Hepatopatía crónica.
- Insuficiencia renal crónica.
- Delgadez (índice de masa corporal  $< 19 \text{ kg/m}^2$ ).
- Síndrome de malabsorción o intervención digestiva.

Las características iniciales de los pacientes que completaron el estudio pueden observarse en la Tabla 3:

<b>VARIABLES CLÍNICAS CUANTITATIVAS</b>				
<i>Característica</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Valor mínimo</i>	<i>Valor máximo</i>
<i>Edad (años)</i>	63,7	12,5	26,0	87,0
<i>Hombres</i>	59,7	16,1	26,0	86,0
<i>Mujeres</i>	64,9	11,0	32,0	87,0
<i>Peso (kg)</i>	69,8	8,4	47,6	93,9
<i>Talla (cm)</i>	162,5	6,8	142,1	183,2
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	29,4	4,2	20,7	39,1
<b>VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS</b>				
<i>Variable</i>		<i>Número de casos (porcentaje)</i>		
<i>DMO cadera</i>	<i>Normal</i>	14 (16,3 %)		
	<i>Osteopenia</i>	56 (65,1 %)		
	<i>Osteoporosis</i>	16 (18,6 %)		
<i>DMO columna lumbar</i>	<i>Normal</i>	12 (14,0 %)		
	<i>Osteopenia</i>	50 (58,1 %)		
	<i>Osteoporosis</i>	24 (27,9 %)		
<i>Fractura osteoporótica</i>		5 (5,8 %)		
<i>Litiasis</i>		44 (51,2 %)		
<i>Insuficiencia renal aguda</i>		2 (2,3 %)		
<i>Hipertensión arterial</i>		40 (46,5 %)		
<i>Asintomático</i>		12 (14,0 %)		

**Tabla 3.** Epidemiología descriptiva de las diferentes variables clínicas.

## **4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Para cada uno de los pacientes, se midieron las siguientes magnitudes bioquímicas:

- Srm—Albúmina; c.masa(CRM 470) \*,
- Srm—25-Hidroxi Vitamina D; c.sust. \*,
- Srm—Calcio; c.sust. \*,
- Srm—C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I; c.masa \*,

- Srm—Fosfato; c.sust. \*,
- Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat. \*,
- Srm—Osteocalcina; c.sust. \* y
- Srm—Paratirina; c.sust. \*

antes de la intervención quirúrgica, el día después de la cirugía y a los 3, 6, (12 – 18) meses posteriores a la paratiroidectomía.

Para cada uno de los pacientes, también se midió el contenido de masa ósea por unidad de superficie (densidad mineral ósea) en la columna lumbar y en la cadera antes de la intervención quirúrgica y a los (12 – 18) meses tras la paratiroidectomía.

A todos los pacientes, además, se les realizó un estudio genético de los siguientes polimorfismos:

- *Apa I*, *Bsm I*, *Fok I* y *Taq I* del gen del receptor de la vitamina D (VDR),
- *C677T* y *A1298C* del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR),
- *Alu I* del gen del receptor de calcitonina (CTR) y
- *Sp1* del gen de la cadena  $\alpha$  del colágeno de tipo I (COL1A1).

\* De acuerdo con la IUPAC y la IFCC, la nomenclatura de las magnitudes bioquímicas se ha realizado de la siguiente forma: Sistema—Componente; tipo de magnitud. Así, Srm = suero, c.sust. = concentración de sustancia, c.masa = concentración de masa y c.cat. = concentración catalítica.



Las muestras sanguíneas se obtuvieron en el Área Premetrológica del Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge. A cada paciente se le realizaron 5 extracciones sanguíneas: antes de la intervención quirúrgica, el día después, entre los (3 – 4), (6 – 7) y (12 – 18) meses posteriores.

En cada extracción sanguínea efectuada, la sangre fue recogida en dos tubos:

- un tubo BD Vacutainer<sup>®</sup> de 5 mL con gel inerte y activador de la coagulación (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) que se utilizó para medir la concentración de sustancia de calcio y fosfato, la concentración de masa de albúmina y la concentración catalítica de fosfatasa alcalina;
- un tubo BD Vacutainer<sup>®</sup> de 8,5 mL con gel inerte y activador de la coagulación (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) que se empleó para medir la concentración de sustancia de 25-hidroxivitamina D y paratirina, y la concentración de masa de C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I y osteocalcina.

Por otro lado, a cada uno de los pacientes, se le realizó una única extracción sanguínea en un tubo BD Vacutainer<sup>®</sup> de 9 mL con EDTA-K<sub>3</sub> (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) que se empleó para realizar los estudios genéticos.

La sangre recogida en los tubos con gel inerte y activador de la coagulación se centrifugó a 2000 g durante 12 minutos previo paso de espera hasta la retracción del coágulo (30 minutos aproximadamente). Las muestras se procesaron el mismo día de la extracción.

La sangre recogida en los tubos con EDTA-K<sub>3</sub> fue conservada a (2 – 8) °C durante un tiempo inferior a una semana hasta el tratamiento de la misma para la extracción del DNA. Las extracciones del DNA y su procesamiento se realizaron a medida que las muestras llegaron al laboratorio.

### **4.3 PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA EMPLEADOS**

#### **4.3.1 Medición de la concentración de sustancia de calcio en el suero**

Se realizó siguiendo un procedimiento de medida recomendado por Gindler *et al* <sup>(68)</sup> en el analizador Modular Hitachi® (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

Mujeres  $\geq$  18 años: (2,15 – 2,51) mmol/L

Hombres  $\geq$  18 años: (2,20 – 2,54) mmol/L

#### **4.3.2 Medición de la concentración de sustancia de fosfato en el suero**

Se realizó siguiendo un procedimiento de medida recomendado por Henry <sup>(69)</sup> en el analizador Modular Hitachi® (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

(0,85 – 1,50) mmol/L

#### **4.3.3 Medición de la concentración de masa de albúmina en el suero**

Se realizó siguiendo un procedimiento de medida recomendado por Doumas *et al* <sup>(70)</sup> en el analizador Modular Hitachi® (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

(33 – 50) g/L

#### **4.3.4 Medición de la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en el suero**

Se realizó siguiendo un procedimiento de medida recomendado por Tietz *et al* <sup>(71)</sup> en el analizador Modular Hitachi® (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

$\leq 1,50 \mu\text{kat/L}$

### **4.3.5 Medición de la concentración de sustancia de paratirina en el suero**

Se realizó en el analizador Immulite 2000<sup>®</sup> (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Ángeles, CA, EUA), que emplea un procedimiento de medida basado en un método enzimoquimioluminiscente no competitivo en fase sólida (método inmunométrico) a 37 °C con dos anticuerpos dirigidos contra la molécula de paratirina.

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

(1,1 – 5,1) pmol/L

### **4.3.6 Medición de la concentración de masa de C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I en el suero**

Se realizó en el analizador Modular E170<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) que emplea un procedimiento de medida basado en un inmunoanálisis heterogéneo no competitivo electroquimioluminiscente (ECLIA) a 37 °C.

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

Mujeres premenopáusicas: (0,01 – 0,39)  $\mu\text{g/L}$

Mujeres postmenopáusicas: (0,06 – 0,80)  $\mu\text{g/L}$

Hombres: (0,08 – 0,80)  $\mu\text{g/L}$

### **4.3.7 Medición de la concentración de masa de osteocalcina en el suero**

Se realizó en el analizador Modular E170<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) que emplea un procedimiento de medida basado en un inmunoanálisis heterogéneo no competitivo electroquimioluminiscente (ECLIA) a 37 °C.

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

Mujeres: (3,0 – 33,0) µg/L

Hombres: (8,4 – 31,0) µg/L

### **4.3.8 Medición de la concentración de sustancia de 25-hidroxi Vitamina D en el suero**

Se realizó adaptando el equipo de reactivos OCTEIA 25-Hydroxy 25-Vitamin D (Immunodiagnosics System, Boldon, Reino Unido) en el analizador Personal Lab Junior<sup>®</sup> (Adaltis, Montreal, Canadá). Este procedimiento de medida cuantifica la 25-Hidroxi Vitamina D<sub>3</sub> en un 100 % y la 25-Hidroxi Vitamina D<sub>2</sub> en un 75 %.

Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son:

(10,0 – 98,0) nmol/L

Para controlar el correcto funcionamiento de todos los procedimientos de medida indicados se procesaron, con cada serie de muestras analizadas:

- dos materiales de control Lipocheck<sup>®</sup> Unnassayed Chemistry Control (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) para la concentración de calcio, fosfato, albúmina y fosfatasa alcalina,
- dos materiales de control valorados Intact PTH immunoassay Control (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Ángeles, CA, EUA) para la concentración de paratirina,
- tres materiales de control valorados PreciBone Control (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) para la concentración de osteocalcina y C-Telopéptidos isomerizados del colágeno de tipo I,
- dos materiales de control valorados incluidos en el equipo de reactivos para la concentración de 25-Hidroxi Vitamina D.

### **4.3.9 Medición de la masa ósea por unidad de superficie (densidad mineral ósea)**

Se realizó en el densitómetro Hologic QDR-4500W (Hologic Inc, Walthman, MA, EUA) que emplea la técnica de absorciometría dual por rayos X (DXA). Este analizador, emplea un método basado en la realización de radiografías digitales cuantitativas para medir el contenido mineral óseo (CMO) en gramos y la densidad mineral ósea (DMO) en gramos por centímetro cuadrado. El procedimiento empleado se basó en la medición del contenido óseo en la columna lumbar (vértebras L2, L3 y L4) y en la cadera (cuello de fémur, trocánter y zona intermedia).

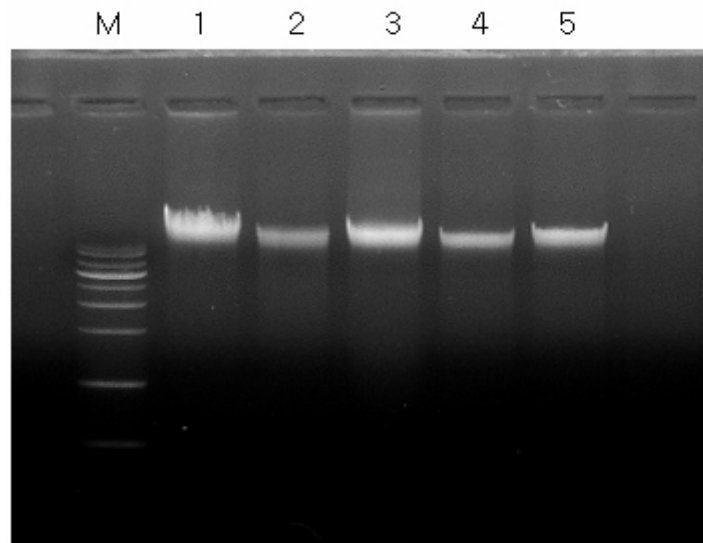
La imprecisión y la resolución de este analizador es del 1 % a una densidad mineral ósea de 1 g/ cm<sup>2</sup> y de 1,5 mm, respectivamente.

El analizador se calibró diariamente con una fantoma normalizada Hologic X-Caliber (Hologic Inc, Walthman, MA, EUA).

Los resultados (densidad mineral ósea y T-Score) fueron obtenidos a partir del software Hologic versión 8.26 incluido en el analizador (Hologic Inc, Walthman, MA, EUA).

### **4.3.10 Extracción de DNA de muestras**

Para la extracción de DNA de las diferentes muestras se utilizó el equipo de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Basel, Suiza). Para determinar su integridad, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa estándar al 0,5 % (0,5 g por cada 100 mL de tampón), que posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se iluminó con luz UV para visualizar las bandas obtenidas. En la Figura 1 se muestra un ejemplo del resultado de este proceso.



**Figura 1.** Bandas correspondientes al DNA extraído.

### **4.3.11 Estudio de los polimorfismos *Taq I* y *Apa I* del gen del receptor de la vitamina D y los polimorfismos *C677T* y *A1298C* del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa**

#### **4.3.11.1 Principio de medida**

El estudio de estos polimorfismos se realizó mediante un procedimiento que permite la detección de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) mediante la digestión, con enzimas de restricción, de fragmentos de DNA amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las mutaciones pueden crear o destruir las dianas reconocidas por enzimas de restricción específicas y conducir a variaciones entre individuos en la longitud de los fragmentos de restricción producidos a partir de regiones idénticas del genoma <sup>(72)</sup>. Tras la PCR y la digestión con la enzima correspondiente, los productos obtenidos son separados electroforéticamente, teñidos con bromuro de etidio y posteriormente visualizados con luz ultravioleta.

Los productos que se observan permiten la clasificación directa por genotipos.

### 4.3.11.2 Procedimiento experimental

#### 4.3.11.2.1 Preparación de reactivos

Los reactivos empleados y su preparación se detallan en la siguiente tabla:

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Agua destilada autoclavada</b>	H <sub>2</sub> O	Lista para su uso.
<b>10 mM dNTPs Mix con dTTP</b> (Applied Biosystems, (Foster City, CA, EUA))	dATP 2,5 mmol/L dGTP 2,5 mmol/L dTTP 2,5 mmol/L dCTP 2,5 mmol/L	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se descongeló el tubo con la solución madre (10 mmol/L) de dNTP.</li> <li>2. Se mezclaron en un tubo eppendorf autoclavado de 1,5 mL (mantenido todo en hielo):               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 270 µL de agua destilada autoclavada.</li> <li>2. 30 µL de la solución madre de dNTP.</li> </ol> </li> </ol> <p>De esta forma obtenemos una mezcla de dNTP 1 mmol/L lista para su uso (solución de trabajo).</p>
<b>Cebador MT677A</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).
<b>Cebador MT677B</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).
<b>Cebador MT1298A</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC -3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Cebador MT1298B</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-GTC TCC CAA CTT ACC CTT CTC CC-3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).
<b>Cebador VDR-TA1</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).
<b>Cebador VDR-TA2</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3'	Las diferentes instrucciones del reactivo especifican la cantidad de agua destilada autoclavada que es necesaria añadir para obtener una concentración de 100 µmol/L (solución de trabajo).
<b>DNA Polimerasa <i>Taq I</i></b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	DNA Polimerasa <i>Taq I</i> 1 U/µL  Tampón 10X con magnesio	Listo para su uso.
<b>Endonucleasa de restricción <i>Hinf I</i></b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	Enzima de restricción <i>Hinf I</i> 10 U/µL  Tampón H/SuRE 10X	Listo para su uso.
<b>Endonucleasa de restricción <i>Mbo II</i></b> (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA)	Enzima de restricción <i>Mbo II</i> 5 U/µL  Tampón NEB2 10X	Listo para su uso.



Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Endonucleasa de restricción <i>Apa I</i></b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	Enzima de restricción <i>Apa I</i> 10 U/ $\mu$ L  Tampón A/SuRE 10X	Listo para su uso.
<b>Endonucleasa de restricción <i>Taq I</i></b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	Enzima de restricción <i>Taq I</i> 10 U/ $\mu$ L  Tampón B/SuRE 10X	Listo para su uso.
<b>Dimetilsulfóxido (DMSO)</b> (Merck, Darmstadt, Alemania)	DMSO	Listo para su uso.
<b>Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)</b> (Merck, Darmstadt, Alemania)	EDTA 0,25 mol/L	Para preparar 100 mL: Se pesaron 9,3 g de EDTA y se disolvieron en agua destilada hasta un volumen final de 100 mL.
<b>Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris)</b> (Merck, Darmstadt, Alemania)	Tris 2 mol/L	Para preparar 100 mL: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se pesaron 24,2 g de Tris.</li> <li>2. Se añadieron aprox. 90 mL de agua destilada y se agitó hasta su completa disolución.</li> <li>3. Se ajustó el pH a 7,5.</li> <li>4. Se añadió agua destilada hasta un volumen final de 100 mL.</li> </ol>

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Tampón TBE 5X</b>	Tris 0,445 mol/L Ácido bórico 0,445 mol/L EDTA 0,01 mol/L	Para preparar 1 L: 1. Se pesaron 60,57 g de Tris (Merck, Darmstadt, Alemania), 27,82 g de ácido bórico (Merck, Darmstadt, Alemania) y 1,86 g de EDTA (Merck, Darmstadt, Alemania). 2. Se añadieron aprox. 900 mL de agua destilada y se agitó hasta su completa disolución. 3. Se ajustó el pH a 8,3. 4. Se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1 L.
<b>Tampón TBE 0,5X</b> (solución de trabajo)	Tris 44,5 mmol/L Ácido bórico 44,5 mmol/L EDTA 1 mmol/L	Se realizó una dilución 1:10 de la solución TBE 5X.
<b>Bromuro de etidio</b> (Sigma Aldrich, St Louis, CA, EUA)	Bromuro de etidio (BrEt) 10 g/L	Para preparar 50 mL: Se pesaron 0,5 g de bromuro de etidio y se disolvieron en agua destilada hasta un volumen final de 50 mL.
<b>Bromuro de etidio</b> (solución de trabajo)	BrEt 1 mg/L	Para preparar 1 L: Se añadieron 100 µL de la solución de BrEt 10 g/L en 999,9 mL de agua destilada.
<b>Tampón TE 1X</b>	Tris 10 mmol/L EDTA 0,25 mmol/L	Para preparar 100 mL: Se añadieron 500 µL de Tris 2 mol/L y 100 µL de EDTA 0,25 mol/L y agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 100 mL.

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>LB 6X</b> (tampón de carga)	Azul de Bromofenol 0,25 % (p/v)  Xilencianol 0,25 % (p/v)  EDTA 60 mmol/L  Glicerol 40 % (v/v)	Para preparar 50 mL:  1. Se pesaron 125 mg de azul de bromofenol (Sigma Aldrich, St Louis, CA, EUA), 125 mg de xilencianol (Sigma Aldrich, St Louis, CA, EUA) y se disolvieron en 12 mL de EDTA 0,25 mol/L.  2. Se añadieron 20 mL de glicerol (Sigma Aldrich, St Louis, CA, EUA) y se completó hasta un volumen final de 50 mL con agua destilada autoclavada.
<b>1 kb DNA Ladder</b> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)	Marcador de tamaño de DNA 1 g/L	Para preparar 5 mL:  1. Se reconstituyó el marcador de tamaño de DNA con 250 µL de agua destilada.  2. Se añadieron 250 µL de la solución del marcador de tamaño de DNA, 1,7 mL de LB 6X y 3,05 mL de TE 1X (mantenido todo en hielo):  De esta forma obtenemos una mezcla del marcador de tamaño de DNA 50 mg/L con el tampón de carga listo para su uso (solución de trabajo).
<b>DNA Molecular Weight Marker V</b> (Roche Applied Science, Basel, Suiza)	Marcador de tamaño de DNA 250 mg/L	Para preparar 1 mL:  1. Se reconstituyó el marcador de tamaño de DNA con 200 µL de agua destilada.  2. Se añadieron 200 µL de la solución del marcador de tamaño de DNA, 200 µL de LB 6X y 600 µL de TE 1X (mantenido todo en hielo):  De esta forma obtenemos una mezcla del marcador de tamaño de DNA 50 mg/L con el tampón de carga listo para su uso (solución de trabajo).

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Agarosa estándar medio EEO</b> (Ecogen SRL, Barcelona, España)	Agarosa (%)	Las diferentes soluciones preparadas (en porcentaje), hacen referencia a la cantidad en gramos de agarosa pesada por 100 mL de tampón TBE 0,5X
<b>Agarosa MetaPhor®</b> (Cambrex, East Rutherford, NJ, EUA)	Agarosa MetaPhor® (%)	Las diferentes soluciones preparadas (en porcentaje), hacen referencia a la cantidad en gramos de agarosa MetaPhor® pesada por 100 mL de tampón TBE 0,5X

### 4.3.11.2.2 Polimorfismos C677T y A1298C del gen de la 5,10-Metilentetrahidrofolato-reductasa

Se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación distintas, una para cada polimorfismo en estudio.

Para realizar la reacción de amplificación, se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

Reactivo	Volumen
Tampón 10x con Mg <sup>2+</sup>	2,5 µL
Cebadores (100 µmol/L)	0,25 µL de cada uno
dNTPs (1 mmol/L)	2,5 µL
DMSO	2,5 µL
Polimerasa Taq (1 U/µL)	0,15 µL
Agua destilada autoclavada	11,85 µL

En un tubo eppendorf autoclavado de 0,2 mL rotulado y preparado previamente, se añadieron 20 µL de la mezcla de reacción y 5 µL de muestra (DNA extraído). Para controlar el correcto funcionamiento del procedimiento, en cada serie de muestras se procesaron dos controles: uno negativo (agua destilada autoclavada) para controlar la posible contaminación generada, y uno positivo (muestra de una serie anteriormente validada).

Posteriormente, se introdujeron los tubos en el termociclador iCycler de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA) empleando el siguiente programa para la reacción de amplificación:

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	4 min
34	94 °C	10 s
	63 °C	25 s
	72 °C	25 s
1	72 °C	5 min
1	15 °C	(permanente, hasta extracción de los tubos del termociclador)

Una vez acabado el proceso de amplificación, se realizaron las diferentes digestiones con las correspondientes enzimas de restricción.

### Polimorfismo C677T del gen del receptor de la vitamina D

Se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

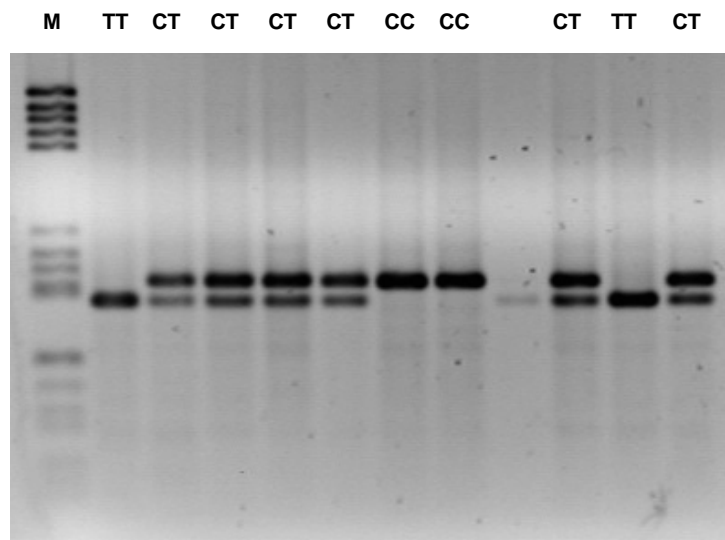
Reactivo	Volumen
Tampón H (10X)	1,2 µL
Enzima <i>Hinf I</i> (10 U/µL)	0,3 µL

En un tubo eppendorf autoclavado de 0,5 mL rotulado y preparado previamente, se añadieron 1,5 µL de la mezcla de reacción y 10,5 µL de DNA amplificado (producto de la PCR).

Posteriormente, se incubaron los tubos a 37 °C durante un mínimo de 4 horas. Transcurrido este tiempo, se separaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en un gel de agarosa MetaPhor® al 2,0 %, que luego se tiñó con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA se

visualizaron iluminando el gel con luz UV, y sus tamaños permitieron la interpretación del genotipo según se muestra en la Figura 2.

Los individuos **CC** presentan una banda de 198 pb, los individuos **CT** tres bandas (198 pb, 175 pb y 23 pb) y los individuos **TT** dos bandas (175 pb y 23 pb).



**Figura 2.** Bandas correspondientes a diversos fragmentos de DNA tras la realización de la digestión con la enzima de restricción *Hinf I* para el polimorfismo C677T del gen de la 5,10-Metilentetrahidrofolato-reductasa.

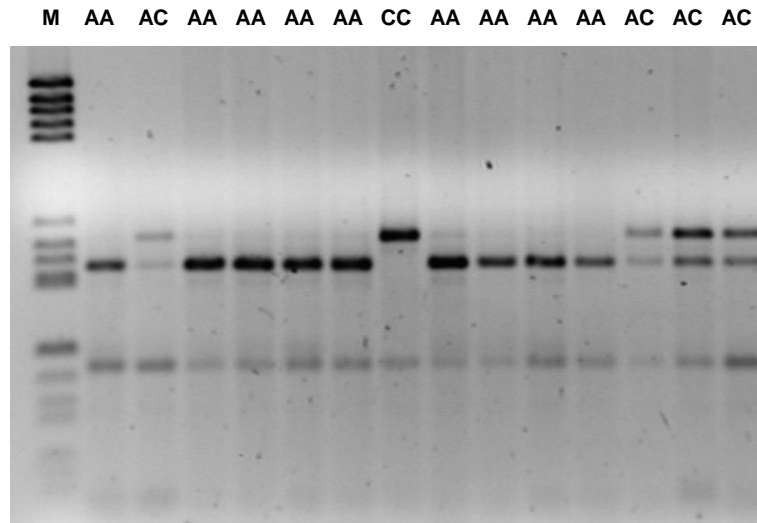
### Polimorfismo A1298C del gen del receptor de la vitamina D

Se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

Reactivo	Volumen
Tampón NEB 2 (10X)	1,2 µL
Enzima <i>Mbo II</i> (5 U/µL)	0,3 µL

El resto del procedimiento es idéntico al del caso anterior. La interpretación correspondiente se observa en la Figura 3.

Los individuos **CC** presentan una banda de 241 pb, los individuos **AC** tres bandas (241 pb, 204 pb y 37 pb) y los individuos **AA** dos bandas (204 pb y 37 pb).



**Figura 3.** Bandas correspondientes a diversos fragmentos de DNA tras la realización de la digestión con la enzima de restricción *Mbo II* para el polimorfismo A1298C del gen de la 5,10-Metilentetrahidrofolato-reductasa.

### 4.3.11.2.3 Polimorfismos *Taq I* y *Apa I* del gen del receptor de la vitamina D

Para el estudio de estos polimorfismos, la reacción de amplificación es común para ambos. Para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

Reactivo	Volumen
Tampón 10x con Mg <sup>2+</sup>	2,5 µL
Cebadores (100 µmol/L)	0,25 µL de cada uno
dNTPs (1 mmol/L)	2,5 µL
DMSO	2,5 µL
Polimerasa Taq (1 U/µL)	0,15 µL
Agua destilada autoclavada	11,85 µL

En un tubo eppendorf autoclavado de 0,2 mL rotulado y preparado previamente, se añadieron 20 µL de la mezcla de reacción y 5 µL de muestra (DNA extraído). Para controlar el correcto funcionamiento del procedimiento, en cada serie de muestras, se procesaron dos controles: un control negativo (agua destilada autoclavada) para controlar la posible contaminación generada, y un control positivo (muestra de una serie anteriormente validada).

Posteriormente, se introdujeron los tubos en el termociclador iCycler de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA) empleando el siguiente programa para la reacción de amplificación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
34	94 °C	45 s
	65 °C	1 min
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min
1	15 °C	(permanente, hasta extracción de los tubos del termociclador)

Una vez acabado el proceso de amplificación, se realizaron las diferentes digestiones con las correspondientes enzimas de restricción.

### Polimorfismo *Taq I* del gen del receptor de la vitamina D

Se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

Reactivo	Volumen
Tampón B (10X)	1,2 µL
Enzima <i>Taq I</i> (10 U/µL)	0,5 µL

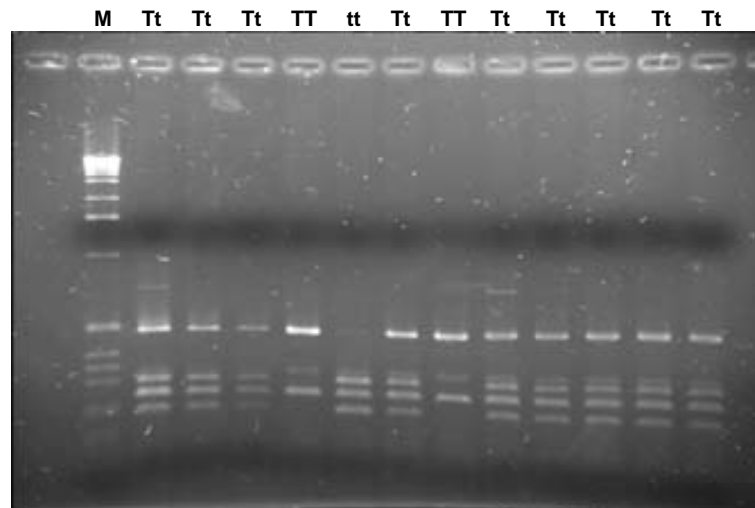
En un tubo eppendorf autoclavado de 0,5 mL rotulado y preparado previamente, se añadieron 1,7 µL de la mezcla de reacción y 10,3 µL de DNA amplificado (producto de la PCR).

Posteriormente, se incubaron los tubos a 65 °C durante un máximo de 4 horas. Transcurrido este tiempo, se separaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, que luego se tiñó con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA se visualizaron



iluminando el gel con luz UV, y sus tamaños permitieron la interpretación del genotipo según se muestra en la Figura 4.

Los individuos **TT** presentan dos bandas (495 pb y 245 pb), los individuos **Tt** cuatro bandas (495 pb, 290 pb, 245 pb y 205 pb) y los individuos **tt** tres bandas (290 pb, 245 pb y 205 pb).



**Figura 4.** Bandas correspondientes a diversos fragmentos de DNA tras la realización de la digestión con la enzima de restricción *Taq I* para el polimorfismo *Taq I* del gen del receptor de la vitamina D.

### Polimorfismo *Apa I* del gen del receptor de la vitamina D

Se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

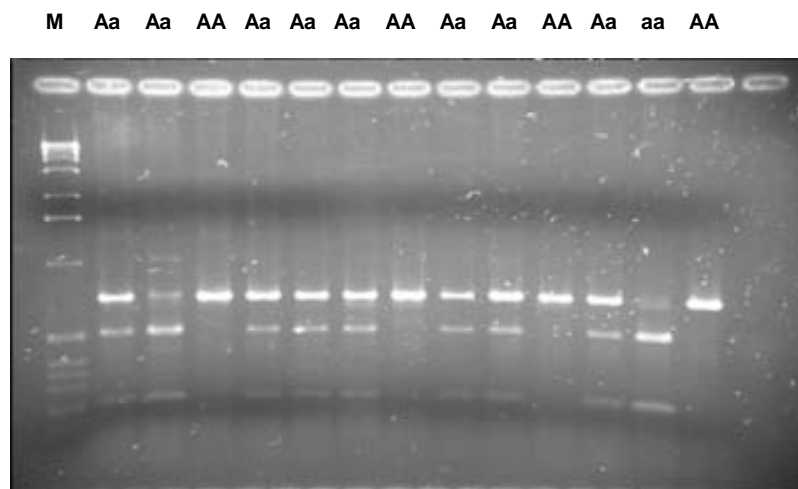
Reactivo	Volumen
Tampón A (10X)	1,3 $\mu$ L
Enzima <i>Apa I</i> (10 U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L

En un tubo eppendorf autoclavado de 0,5 mL rotulado y preparado previamente, se añadieron 1,8  $\mu$ L de la mezcla de reacción y 11,2  $\mu$ L de DNA amplificado (producto de la PCR).

Posteriormente, se incubaron los tubos a 30 °C durante un mínimo de 12 horas (una noche). Transcurrido este tiempo, se separaron los fragmentos obtenidos mediante

electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, que luego se tiñó con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA se visualizaron iluminando el gel con luz UV, y sus tamaños permitieron la interpretación del genotipo según se muestra en la Figura 5.

Los individuos **AA** presentan una banda de 745 pb, los individuos **Aa** tres bandas (745 pb, 530 pb y 210 pb) y los individuos **aa** dos bandas (530 pb y 210 pb).



**Figura 5.** Bandas correspondientes a diversos fragmentos de DNA tras la realización de la digestión con la enzima de restricción *Apa I* para el polimorfismo *Apa I* del gen del receptor de la vitamina D.

### 4.3.12 Estudio de los polimorfismos *Bsm I* y *Fok I* del gen del receptor de la vitamina D, el polimorfismo *Alu I* del gen del receptor de calcitonina y el polimorfismo *Sp1* del gen de la cadena $\alpha$ del colágeno de tipo I (COL1A1)

#### 4.3.12.1 Principio de medida

El estudio de estos polimorfismos se llevó a cabo mediante un procedimiento que permite la detección de seis polimorfismos de un nucleótido simple (SNP). Este procedimiento se basa en la amplificación de fragmentos específicos del genoma humano y posterior detección mediante la hibridación con sondas específicas. Primero, se realiza una reacción simultánea de amplificación de 5 regiones del

genoma, cada una de ellas de (150 – 250) pb, que contienen los SNP de interés mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, se lleva a cabo la detección de estos fragmentos de DNA amplificado mediante el uso de una plataforma tecnológica basada en micro-arrays de baja densidad. Durante la PCR, los productos amplificados son marcados con biotina. Seguidamente, después de la amplificación, las muestras marcadas son hibridadas con unas sondas específicas que se encuentran inmovilizadas en un micro-array incorporado en un tubo (tubo AT). Después, las muestras son incubadas con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Este conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados y que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas. La actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia de un sustrato: 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB), con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del tubo AT en las que ocurre la hibridación.

Los productos que se observan permiten la clasificación directa por genotipos.

### 4.3.12.1.1 Preparación de reactivos

La preparación de reactivos se realizó siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Los reactivos empleados y la preparación de los mismos, pueden observarse en la siguiente tabla:

Nombre reactivo	Composición	Preparación
Agua destilada autoclavada	H <sub>2</sub> O	Lista para su uso.
Mezcla de la reacción de amplificación	Desconocida	Lista para su uso.
Solución SH (solución de hibridación)	Desconocida	Se calentó la solución en un baño a 50 °C hasta la desaparición de los cristales de la solución.
Solución TL (tampón de lavado 5X)	Desconocida	Lista para su uso.

Nombre reactivo	Composición	Preparación
<b>Solución TL diluída</b>	Desconocida	Por cada muestra a procesar: Se añadieron 1,13 mL de agua destilada autoclavada y 0,13 mL de la solución TL en un tubo cónico de 50 mL. Posteriormente, se agitó la solución mediante inversión.
<b>Solución DC</b> (diluyente del conjugado)	Desconocida	Lista para su uso.
<b>Solución CJ</b> (solución del conjugado)	Desconocida	Lista para su uso.
<b>Solución CJ diluída</b>	Desconocida	Por cada muestra a procesar: Se añadieron 0,72 $\mu$ L de la solución CJ y 99,28 $\mu$ L de la solución DC en un tubo eppendorf de 1,5 mL (mantenidas en hielo). Posteriormente, se agitó la mezcla anterior mediante inversión y se dejó en hielo hasta su uso.
<b>Solución RE</b> (solución de revelado)	Desconocida	Lista para su uso.
<b>Tubos AT</b> (tubos con el microarray)	Desconocida	Listos para su uso.

### 4.3.12.2 Proceso experimental

El estudio de estos polimorfismos, se realizó empleando los equipos de reactivos MetaBone Clinical Arrays<sup>®</sup> y MetaBone Clinical Arrays<sup>®</sup> Visu (Genomica SAU, Coslada, Madrid, España) y siguiendo las instrucciones indicadas en los prospectos de los mismos.

En primer lugar, se realizó una reacción de amplificación y posteriormente la visualización del producto amplificado.

Para realizar la reacción de amplificación, se descongeló un tubo de reacción, que contiene la mezcla de reacción para la amplificación, por cada muestra de DNA extraído a estudiar. Una vez descongelados, se centrifugaron unos segundos en una microcentrífuga y se añadieron 5  $\mu$ L de muestra (DNA extraído). Para controlar el

correcto funcionamiento del procedimiento, para cada serie de muestras, se procesaron dos controles: uno negativo (agua destilada autoclavada) para controlar la posible contaminación generada, y uno positivo (muestra de una serie anteriormente validada).

Posteriormente, se introdujeron los tubos en el termociclador iCycler de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA) empleando el siguiente programa para la reacción de amplificación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	12 min
40	95 °C	30 s
	55 °C	40 s
	72 °C	1 min
1	60 °C	30 min
1	15 °C	(permanente, hasta extracción de los tubos del termociclador)

Una vez finalizada la reacción de amplificación, se realizó la visualización del producto amplificado. Para ello:

- 1) En un tubo eppendorf, se añadieron 5 µL del producto de DNA amplificado y 95 µL de la solución SH.
- 2) Se incubaron los tubos a 95 °C durante 5 minutos (reacción de desnaturalización).
- 3) Se añadieron 300 µL de la solución de TL diluída a cada tubo AT y se invirtieron los tubos AT 4 o 5 veces. Posteriormente, se desechó la solución TL diluída mediante aspiración.
- 4) Se colocaron los tubos AT lavados en un termobloque, calentado previamente, a 50 °C.

- 5) Se añadieron los 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones recién desnaturalizadas sobre los correspondientes tubos AT ubicados en el termobloque.
- 6) Se incubaron los tubos AT durante 1,5 horas en agitación a 550 revoluciones por minuto.
- 7) Tras la incubación, se sacaron los tubos AT del termobloque y se desechó la solución SH mediante aspiración.
- 8) Se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de la solución TL diluída a cada tubo AT y se invirtieron los tubos AT 10 veces desechándose la solución TL diluída mediante aspiración.
- 9) Se colocaron los tubos AT en el termobloque, enfriado previamente, a 30  $^{\circ}\text{C}$ .
- 10) Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución CJ diluída a cada uno de los tubos AT.
- 11) Se incubaron los tubos AT durante 30 minutos en agitación a 550 revoluciones por minuto.
- 12) Tras la incubación, se sacaron los tubos AT del termobloque y se desechó rápidamente la solución CJ diluída mediante aspiración.
- 13) Se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de la solución TL diluída a cada tubo AT y se invirtieron los tubos AT 10 veces. Seguidamente, se desechó rápidamente la solución TL diluída mediante aspiración. Posteriormente, se repitió este proceso.
- 14) Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución RE a todos los tubos AT en el mismo orden con la que se aspiró la solución.
- 15) Se colocaron los tubos AT en un termobloque, enfriado previamente, a 25  $^{\circ}\text{C}$ .
- 16) Se incubaron los tubos AT durante 10 minutos y en ausencia de agitación.
- 17) A los 10 minutos se colocaron los tubos AT en el lector de tubos Array en el mismo orden en el que se fue añadiendo la solución RE.

El lector de tubos Array, para cada muestra, presenta el siguiente informe:

RESULTADOS Análisis de osteoporosis		Código del análisis: 040304
Referencia del Análisis:	320756	
Código AT:	17432403040304	
Tipo de análisis:	tmb a punto final	
Fecha y hora:	2008-01-14 20:12	

Gen - Polimorfismo	Resultado	Controles
Col1A1 - Sp1	Ss	Conforme
CTR - AluI	aa	Conforme
VDR - BsmI	Bb	Conforme
VDR - FokI	Ff	Conforme

### INFORMACIÓN DEL SISTEMA

Fecha de la última verificación:	2008-01-14
Resultado de la última verificación:	Ok
Estado de temperatura:	Ok
Sistema:	ATS

Este protocolo fue generado por el dispositivo de ATS.

DATOS DE LECTURA Análisis de osteoporosis		Código de análisis: 040304
Referencia del análisis:	320756	
Código AT:	17432403040304	
Tipo de análisis:	tmb a punto final	
Fecha y hora:	2008-01-14 20:12	

SONDAS

Sonda	Señal
COLT-S19-AR	0.3365
CTRTR-A15-AR	0.8160
VDRBT-A20-AR	0.7392
VDRFA-A15-AR	0.8183
COL1A1-2-20COL	0.7809
CTRC-A15-AR	0.8129
VDRBC-A20-AR	0.7141
VDRFG-A15-AR	0.7343
COL1-A1-1-20	0.8008
VDRBT-A21-AR	0.7844

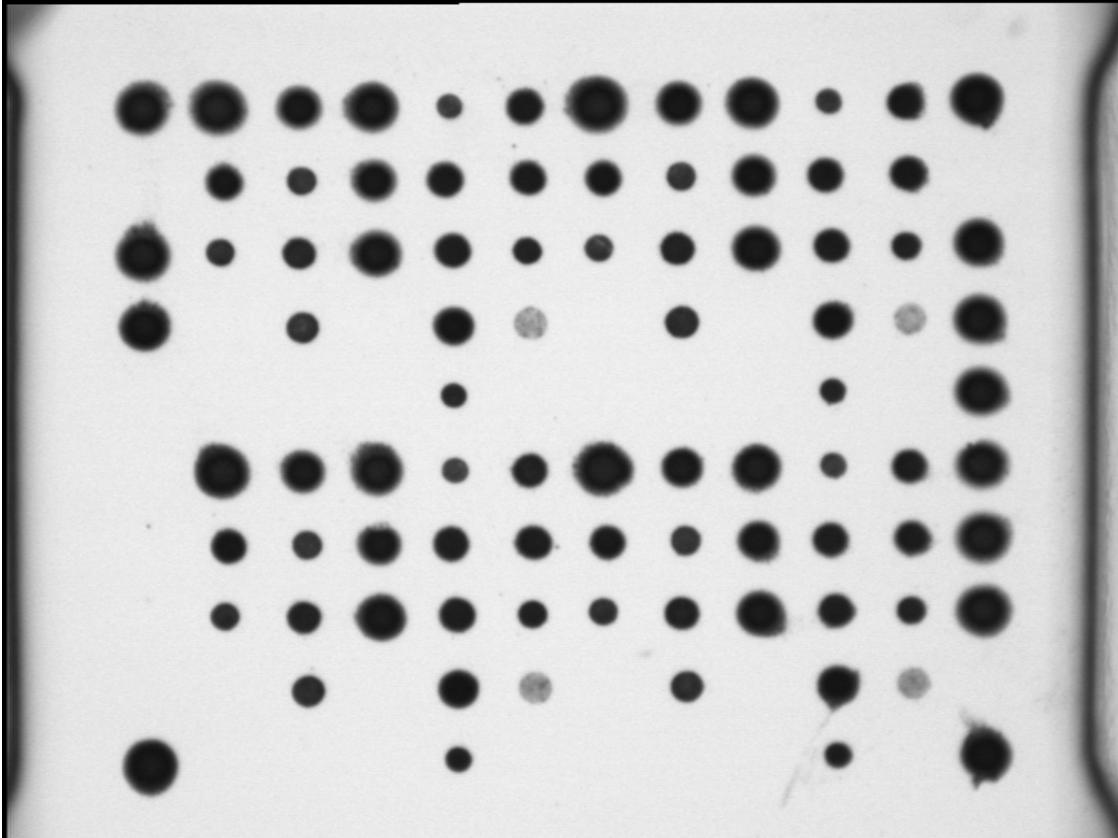
CONTROLES

Controles	Señal	Resultado
COL common-antisense	0.7943	Conforme
CTR common	0.7988	Conforme
VDR-B common	0.8111	Conforme
VDR-F common	0.7770	Conforme

Este protocolo fue generado por el dispositivo de ATS.

IMAGEN Análisis de osteoporosis		Código de análisis: 040304
Referencia del análisis:	320756	
Código AT:	17432403040304	
Tipo de análisis:	tmb a punto final	
Fecha y hora:	2008-01-14 20:12	





Este protocolo fue generado por el dispositivo de ATS.

#### ***4.4 PROCEDIMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO***

Para la comparación de los valores medios de las magnitudes, en los diferentes momentos estudiados de la evolución de los pacientes, se empleó la prueba paramétrica ANOVA para datos apareados.

Para comparar los valores medios de las densidades minerales óseas (DMO) y de los T-Score, antes de la cirugía y a los (12 – 18) posteriores a la intervención, se utilizó la prueba paramétrica de la T de Student de datos apareados.

Para relacionar los cambios en la masa ósea con las concentraciones preoperatorias de paratirina y los diferentes marcadores óseos, así como con los cambios de las concentraciones de los mismos, se empleó la prueba de correlación de Pearson.

Para comparar las diferentes frecuencias alélicas se utilizó la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

El cálculo de las diferentes áreas globales bajo la curva (AUC) se realizó para cada uno de los individuos, empleando los diferentes momentos en estudio (previo a la intervención, día después y 3, 6 y 12 – 18 meses posteriores) y la concentración del marcador óseo obtenido en cada momento considerado, aplicando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{[(Concentración el día después + Concentración previa a la intervención) x} \\ & \text{0,0333]} / 2 + \text{[(Concentración al tercer mes + Concentración el día después) x} \\ & \text{3]} / 2 + \text{[(Concentración al sexto mes + Concentración al tercer mes) x 3]} / 2 + \\ & \text{[(Concentración al 12 – 18 mes + Concentración al sexto mes) x 12]} / 2 \end{aligned}$$

Posteriormente, se calcularon los valores medianos de las AUC obtenidas en función de los diferentes genotipos de cada polimorfismo estudiado.

Para comparar las AUC medianas y las AUC medianas agrupadas obtenidas para los distintos marcadores óseos en función de los genotipos de un mismo polimorfismo, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y la U-Mann Whitney, respectivamente. Además, para conocer qué grupos de datos diferían estadísticamente, se realizó la prueba de contrastes LSD.

Para comparar las áreas globales bajo la curva (AUC) medianas de cada uno de los marcadores óseos en función del número de alelos de peor evolución, se empleó la prueba no paramétrica de la U-Mann Whitney.

Todos estos cálculos se realizaron utilizando el programa estadístico Analyse-it<sup>®</sup> (Leeds, Inglaterra, Reino Unido) versión 2.0.4, seleccionando un nivel de significación estadística de 0,05.

## **5. RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO, FOSFATO, 25-HIDROXI VITAMINA D Y PARATIRINA

Los valores medios de estas concentraciones en los diferentes momentos evolutivos estudiados se muestran en la Tabla 4. La prueba paramétrica ANOVA, indicó la existencia de diferencias significativas entre estos valores a lo largo del tiempo.

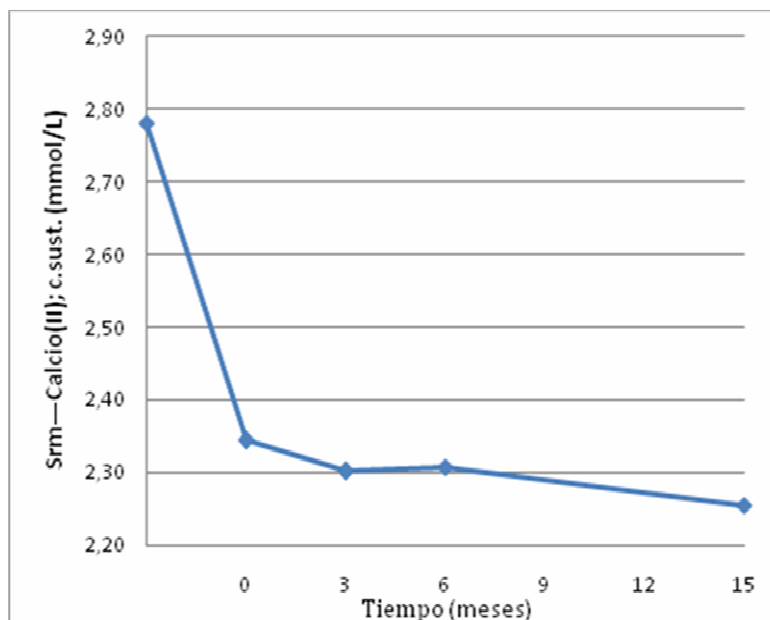
Magnitud	Momentos de medición					P ANOVA
	Antes	Día después	3 meses después	6 meses después	(12 – 18) meses después	
Srm—Calcio(II); c.sust.(mmol/L)	2,78 (2,72 – 2,84)	2,34 (2,28 – 2,41)	2,30 (2,27 – 2,33)	2,31 (2,28 – 2,34)	2,26 (2,22 – 2,29)	<0,0001
Srm—Fosfato; c.sust. (mmol/L)	0,81 (0,77 – 0,84)	1,02 (0,94 – 1,10)	1,11 (1,06 – 1,15)	1,09 (1,03 – 1,15)	1,16 (1,11 – 1,20)	<0,0001
Srm—25-Hidroxi Vitamina D; c.sust. (nmol/L)	40,3 (36,0 – 44,6)	—	53,2 (46,8 – 59,7)	56,2 (49,0 – 63,4)	53,8 (48,2 – 59,3)	<0,0001
Srm—Paratirina; c.sust.(pmol/L)	21,0 (18,1 – 23,9)	2,8 (2,2 – 3,3)	6,8 (5,9 – 7,7)	6,1 (5,2 – 7,0)	5,7 (5,0 – 6,4)	<0,0001

**Tabla 4.** Evolución de las concentraciones de calcio, fosfato, 25-Hidroxi Vitamina D y paratirina en diferentes momentos relativos a la paratiroidectomía. Los resultados son expresados mediante las medias y sus correspondientes intervalos de confianza del 95 %.

#### Calcio

En la Figura 6 se muestra el perfil evolutivo de las concentraciones de calcio. Antes de la intervención quirúrgica, éstas se encontraban por encima del límite superior del intervalo de referencia (2,51 mmol/L para mujeres y 2,54 para hombres), pero tras la paratiroidectomía disminuyeron hasta alcanzar valores fisiológicos. Estas disminuciones fueron estadísticamente significativas, siendo el mayor descenso el que tuvo lugar entre los meses previos a la cirugía y el día posterior a la intervención.

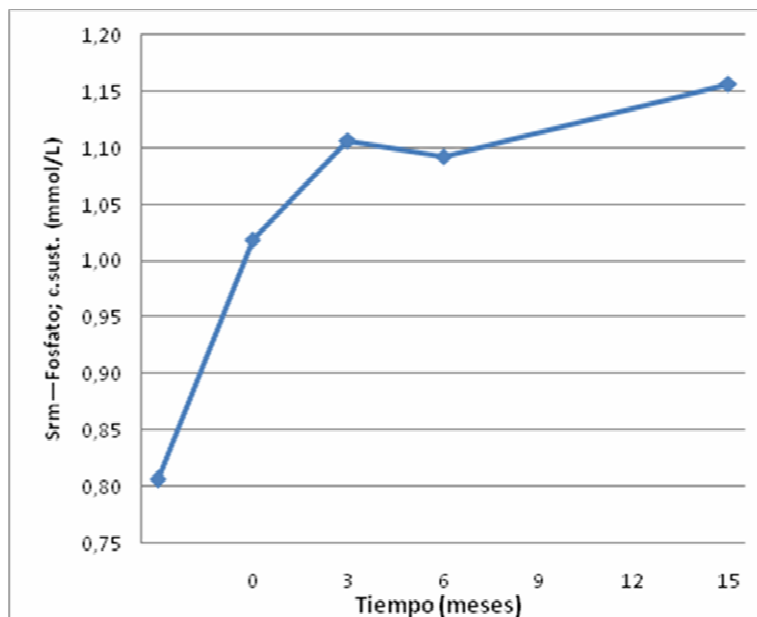
Aunque entre los meses 3 y 6 tras la operación la concentración de calcio parecía haberse estabilizado, se observó un nuevo descenso significativo ( $p=0,002$ ) entre el sexto mes y los (12 – 18) meses.



**Figura 6.** Evolución de las concentraciones de calcio en los diferentes momentos considerados.

### Fosfato

Las concentraciones de fosfato estuvieron por debajo del límite inferior del intervalo de referencia (0,85 mmol/L para mujeres y hombres) únicamente en el momento previo a la paratiroidectomía. Como puede observarse en la Figura 7, tras la operación se registraron aumentos casi continuados en la concentración de fosfato (excepto en el período entre los meses 3 y 6 tras la intervención). Estos aumentos fueron estadísticamente significativos, siendo el mayor el observado entre los meses previos a la cirugía y el día siguiente de la operación ( $p<0,001$ ). Cabe destacar que los sucesivos aumentos posteriores fueron cada vez menos significativos (hasta los 3 meses,  $p=0,0076$ ; de los 6 a los (12 – 18) meses,  $p=0,0238$ ).

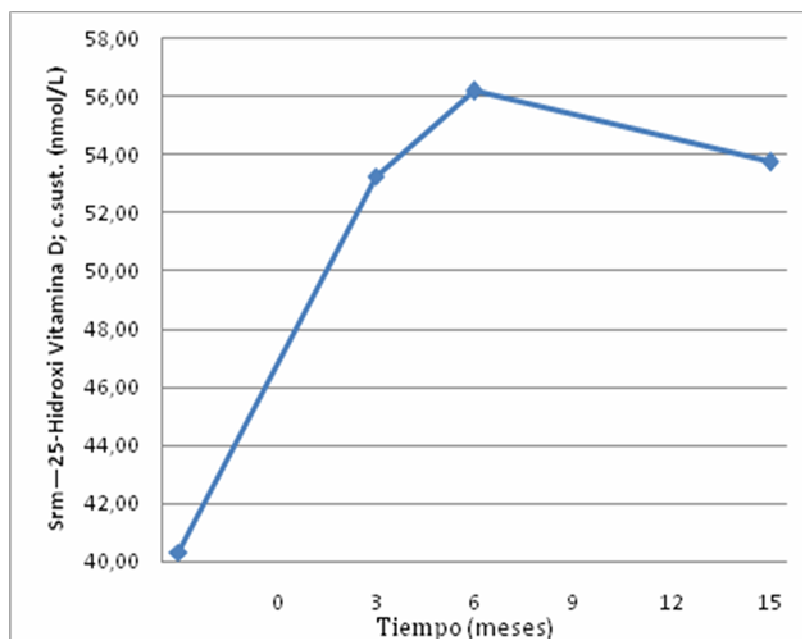


**Figura 7.** Evolución de las concentraciones de fosfato en los diferentes momentos considerados.

### **25-Hidroxi vitamina D**

Los valores de 25-hidroxi vitamina D permanecieron, en todo los periodos estudiados, dentro del intervalo de referencia (entre 10,0 y 98,0 nmol/L). Como se observa en la Figura 8, al igual que ocurría para el fosfato, después de la intervención quirúrgica se observó un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de 25-hidroxi vitamina D entre los meses previos a la cirugía y el tercer posterior a la intervención.

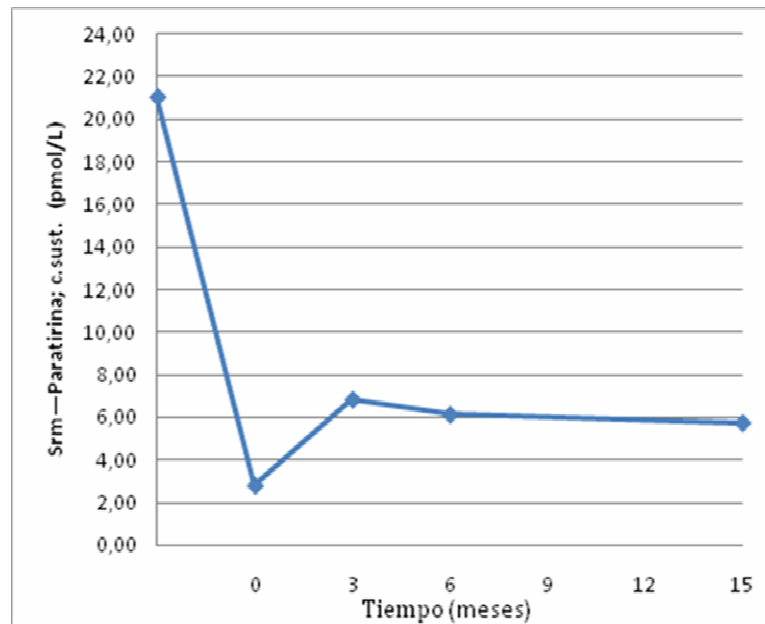
Tras la paratiroidectomía, se observó una estabilización de las concentraciones de 25-hidroxi vitamina D a largo plazo.



**Figura 8.** Evolución de las concentraciones de 25-Hidroxi vitamina D en los diferentes momentos considerados.

### Paratirina

El hiperparatiroidismo primario se caracteriza por concentraciones elevadas de paratirina, y la disminución hasta valores fisiológicos es uno de los indicadores del éxito de la paratiroidectomía. Como se observa en la Figura 9, tras la drástica disminución de la concentración de paratirina tras la cirugía, se observó una estabilización a corto plazo de la misma. Cabe destacar, que entre el día después de la cirugía y el mes 3 posterior a la intervención, las concentraciones de paratirina aumentaron debido, fundamentalmente, a una recuperación de las glándulas paratiroides tras la cirugía.



**Figura 9.** Cambios en las concentraciones de paratirina en los diferentes momentos considerados.

## **5.2 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS**

En la Tabla 5, se muestran las concentraciones medias de los marcadores óseos en los diferentes momentos considerados, junto con el resultado de la prueba estadística, que demuestra la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones medias de fosfatasa alcalina, C-Telopéptido isomerizado del colágeno tipo I y osteocalcina.

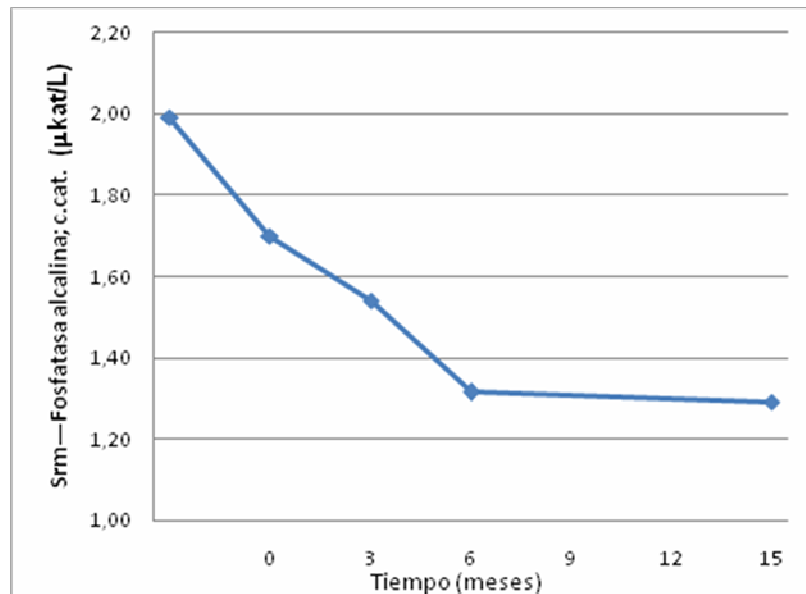


Magnitud	Momentos de medición					P ANOVA
	Antes	Día después	3 meses	6 meses	(12 – 18) meses	
Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat. ( $\mu$ kat/L)	1,99 (1,71 – 2,28)	1,70 (1,52 – 1,87)	1,54 (1,37 – 1,71)	1,31 (1,21 – 1,42)	1,29 (1,19 – 1,39)	<0,0001
Srm—C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I; c.masa ( $\mu$ g/L)	0,71 (0,62 – 0,81)	0,29 (0,15 – 0,43)	0,30 (0,23 – 0,38)	0,24 (0,18 – 0,30)	0,28 (0,23 – 0,34)	<0,0001
Srm—Osteocalcina; c.masa ( $\mu$ g/L)	40,9 (35,0 – 46,8)	40,0 (30,8 – 49,3)	23,2 (19,9 – 26,5)	17,6 (15,6 – 19,7)	16,6 (15,0 – 18,2)	<0,0001

**Tabla 5.** Evolución de las concentraciones de los marcadores óseos en los diferentes momentos considerados con respecto a la paratiroidectomía. Los resultados son expresados mediante las medias y sus correspondientes intervalos de confianza del 95 %.

### 5.2.1 Fosfatasa alcalina

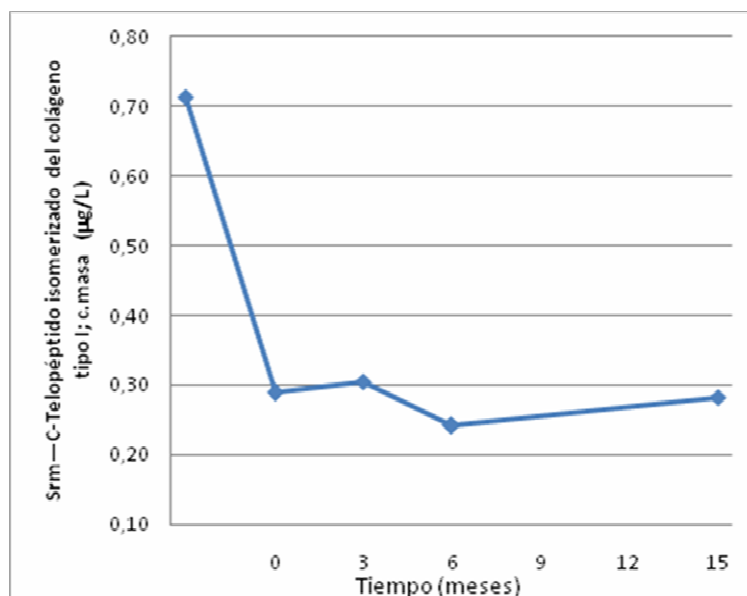
Antes de la intervención quirúrgica, las concentraciones de fosfatasa alcalina se encontraban por encima del límite superior del intervalo de referencia (1,50  $\mu$ kat/L para mujeres y hombres), alcanzando valores fisiológicos a partir del sexto mes posterior a la intervención. Tras la cirugía se observó un descenso progresivo de las concentraciones de fosfatasa alcalina, que resultó ser estadísticamente significativo (Figura 10). Los sucesivos descensos fueron similares en el período entre los meses previos a la cirugía y el día siguiente de la operación y el mes 6 posterior a la intervención. A partir de este momento, se observó una estabilización, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de fosfatasa alcalina entre los meses posteriores.



**Figura 10.** Evolución de las concentraciones de fosfatasa alcalina en los diferentes momentos considerados.

### 5.2.2 C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I (CTx)

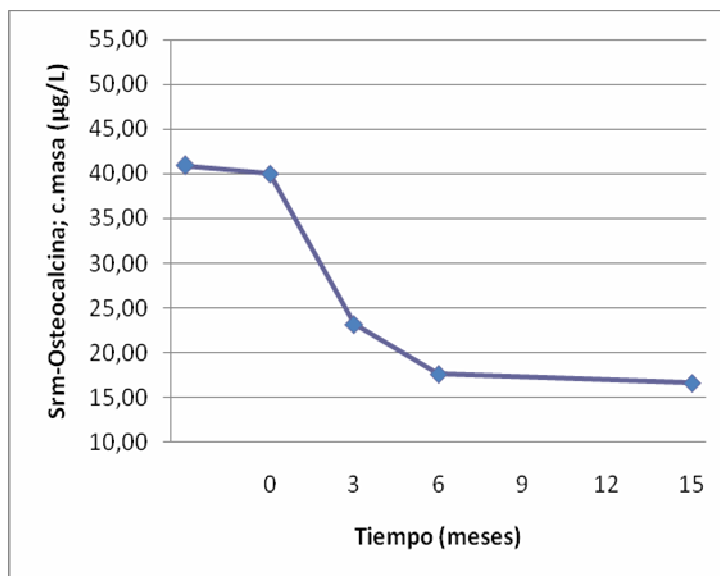
Los valores de CTx permanecieron, en todo los momentos considerados, dentro del intervalo de referencia ( $0,8 \mu\text{g/L}$  para mujeres postmenopúsicas y hombres). Como puede observarse en la Figura 11, tras la intervención quirúrgica, se registró un descenso estadísticamente significativo en la concentración de CTx el día siguiente de la operación y una estabilización de las mismas puesto que desde el día después de la cirugía hasta el mes (12 – 18) posterior a la intervención, éstas se mantuvieron prácticamente constantes.



**Figura 11.** Evolución de las concentraciones de C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I en los diferentes momentos considerados.

### 5.2.3 Osteocalcina

En la evolución de la concentración de osteocalcina que se muestra en la Figura 12, puede verse que en la situación de partida, antes de la operación, los valores estaban por encima del intervalo de referencia (33 µg/L para mujeres y 30 µg/L para hombres) al igual que al día siguiente de la operación. Tras la cirugía, se observaron descensos significativos en las concentraciones de osteocalcina durante todos los momentos considerados, excepto entre los meses previos a la intervención y el día posterior. El mayor descenso se observó entre los meses 3 y 6 posterior a la intervención. A partir del sexto mes, las concentraciones de osteocalcina se mantuvieron prácticamente estables dentro del intervalo de referencia.



**Figura 12.** Evolución de las concentraciones de osteocalcina en los diferentes periodos de tiempo.

### 5.3 EVOLUCIÓN DE LA MASA ÓSEA POR UNIDAD DE SUPERFICIE (DENSIDAD MINERAL ÓSEA)

En la Tabla 6, se muestran las diferentes densidades minerales óseas tanto en unidades de masa ósea por unidad de superficie como en T-Score antes de la intervención y a los (12 – 18) meses posteriores a la cirugía, junto con el resultado de la prueba estadística, que demuestra el aumento significativo de las densidades minerales óseas de cadera y columna lumbar.

Magnitud	Momento de medición		<i>P</i> <i>t-Student</i> <i>apareada</i>	Porcentaje Ascenso relativo
	<i>Antes</i>	(12 -18) meses		
DMO cadera (g/cm <sup>2</sup> )	0,775 (0,740 – 0,810)	0,814 (0,780 – 0,847)	<0,0001	5,0 %
T-Score	-1,9 (-2,1 – -1,6)	-1,5 (-1,8 – -1,3)	<0,0001	21,1 %
DMO Columna lumbar (g/cm <sup>2</sup> )	0,803 (0,768 – 0,838)	0,842 (0,804 – 0,880)	<0,0001	4,9 %
T-Score	-2,2 (-2,5 – -1,8)	-1,8 (-2,1 – -1,4)	<0,0001	18,1 %

**Tabla 6.** Evolución de la densidad mineral ósea. Los resultados son expresados mediante las medias y sus correspondientes intervalos de confianza del 95 %. El porcentaje de ascenso relativo se calculó como [(DMO 12 -18 meses – DMO antes)/(DMO antes)]\*100.

## **5.4 RELACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS EN LA MASA ÓSEA, PARATIRINA Y MARCADORES ÓSEOS**

Para conocer el grado de afectación de la masa ósea debido a la presencia de concentraciones mantenidas y elevadas de paratirina (PTH), se realizaron estudios de correlación entre la DMO antes de la cirugía y las concentraciones preoperatorias de PTH. Existió una correlación estadísticamente significativa ( $P = 0,0484$ ) entre la DMO en la zona de la cadera y las concentraciones de PTH preoperatorias ( $r = -0,2259$ ; IC = -0,4787; - 0,0021). El grado de correlación entre la DMO en la zona de la columna lumbar y las concentraciones preoperatorias de PTH fue de -0,0988 (IC = -0,3482; 0,1637).

Por otro lado, para relacionar los cambios en la masa ósea con los cambios en las concentraciones de PTH y los diferentes marcadores óseos, se realizaron estudios de correlación entre éstos y la DMO.

Los cambios en las concentraciones de paratirina y los marcadores óseos en los diferentes momentos estudiados se calcularon como: el valor absoluto de la [(Concentración en un momento posterior a la cirugía – Concentración antes de la intervención) / Concentración antes de la intervención]\*100, mientras que los cambios en la DMO se calcularon mediante la fórmula: [(DMO 12 – 18 meses – DMO antes)/(DMO antes)]\*100.

### **5.4.1 Correlación entre las concentraciones preoperatorias de PTH y marcadores óseos con los cambios en la DMO**

Existió una correlación significativa positiva entre las concentraciones preoperatorias de PTH y fosfatasa alcalina con los incrementos de DMO en columna lumbar y cadera (Tabla 7).

	Incremento DMO en la zona lumbar	Incremento DMO en la zona de la cadera
Srm—Paratirina; c.sust. (preoperatoria)	$r = 0,2399$ $P = 0,0114$	$r = 0,2716$ $P = 0,0410$
Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat. (preoperatoria)	$r = 0,2533$ $P = 0,0451$	$r = 0,2516$ $P = 0,0438$
Srm—C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I; c.masa (preoperatoria)	$r = - 0,0076$ $P = 0,9579$	$r = - 0,0072$ $P = 0,9613$
Srm—Osteocalcina; c.masa (preoperatoria)	$r = 0,1908$ $P = 0,1754$	$r = 0,1457$ $P = 0,2978$

**Tabla 7.** Coeficientes de correlación ( $r$ ) y probabilidades estadísticas ( $P$ ) obtenidos al correlacionar las concentraciones preoperatorias de PTH, fosfatasa alcalina, CTx y osteocalcina con los incrementos en la DMO en la zona de la columna lumbar y en cadera.

#### 5.4.2 Correlación entre los cambios en las concentraciones de PTH y marcadores óseos en diferentes momentos con los cambios en la DMO

Se observó una correlación significativa positiva en todos los casos estudiados excepto entre los incrementos de DMO en columna lumbar con los cambios en las concentraciones de: PTH, CTx y osteocalcina al día después de la intervención, osteocalcina a los 3 meses posteriores a la paratiroidectomía y fosfatasa alcalina a los (12 – 18) meses posteriores a la cirugía (Tabla 8). Tampoco se encontró correlación entre los incrementos de DMO en la cadera con los cambios en las concentraciones de: PTH, fosfatasa alcalina, CTx, osteocalcina el día después de la intervención y osteocalcina a los 3 meses posteriores a la paratiroidectomía (Tabla 8).

<b>Cambios en la concentración de PTH</b>				
<b>Incrementos en la DMO</b>	<i>Día después</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>(12 – 18) meses</i>
Zona Columna Lumbar	$r = 0,2464$ $P = 0,0577$	$r = 0,3967$ $P = 0,0020$	$r = 0,3409$ $P = 0,0134$	$r = 0,3713$ $P = 0,0057$
Zona Cadera	$r = 0,2008$ $P = 0,1240$	$r = 0,3901$ $P = 0,0025$	$r = 0,3209$ $P = 0,0231$	$r = 0,2855$ $P = 0,0364$
<b>Cambios en la concentración de ALP</b>				
<b>Incrementos en la DMO</b>	<i>Día después</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>(12 – 18) meses</i>
Zona Columna Lumbar	$r = 0,3632$ $P = 0,0167$	$r = 0,2924$ $P = 0,0259$	$r = 0,3016$ $P = 0,0298$	$r = 0,1692$ $P = 0,2168$
Zona Cadera	$r = 0,1559$ $P = 0,3243$	$r = 0,3702$ $P = 0,0042$	$r = 0,3393$ $P = 0,0139$	$r = 0,3219$ $P = 0,0226$
<b>Cambios en la concentración de CTx</b>				
<b>Incrementos en la DMO</b>	<i>Día después</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>(12 – 18) meses</i>
Zona Columna Lumbar	$r = 0,1641$ $P = 0,3776$	$r = 0,4020$ $P = 0,0051$	$r = 0,5133$ $P = 0,0004$	$r = 0,3457$ $P = 0,0200$
Zona Cadera	$r = 0,3129$ $P = 0,0866$	$r = 0,2984$ $P = 0,0416$	$r = 0,3377$ $P = 0,0268$	$r = 0,4065$ $P = 0,0083$
<b>Cambios en la concentración de OC</b>				
<b>Incrementos en la DMO</b>	<i>Día después</i>	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>	<i>(12 – 18) meses</i>
Zona Columna Lumbar	$r = 0,0815$ $P = 0,6574$	$r = 0,2200$ $P = 0,1418$	$r = 0,4332$ $P = 0,0033$	$r = 0,3401$ $P = 0,0193$
Zona Cadera	$r = 0,1076$ $P = 0,5647$	$r = 0,0976$ $P = 0,5187$	$r = 0,4308$ $P = 0,0035$	$r = 0,3388$ $P = 0,0213$

**Tabla 8.** Coeficientes de correlación ( $r$ ) y probabilidades estadísticas ( $P$ ) obtenidos al correlacionar los cambios en las concentraciones de PTH, fosfatasa alcalina, CTx y osteocalcina con los incrementos en la DMO en la zona de la columna lumbar y en cadera.

## **5.5 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS**

Los resultados obtenidos para las frecuencias genotípicas y alélicas de nuestra población estudiada así como las frecuencias alélicas de una población europea de individuos sanos, pueden observarse en la Tabla 9.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de ambas poblaciones estudiadas, para los polimorfismos *C677T* del gen de MTHFR, *Taq I* del gen de VDR y *Sp1* del COL1A1.

Por otro lado, la distribución genotípica de todos los polimorfismos estudiados se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Polimorfismo (gen)	Frecuencia genotípica	Frecuencia Alélica	<i>P</i> (H-W)	Frecuencia alélica poblacional	<i>P</i> ( $\chi^2$ )
<i>c.677C&gt;T</i> ó <i>c.849C&gt;T</i> rs1801133 (MTHFR)	CC = 24 (32 %) CT = 36 (48 %) TT = 15 (20 %)	C = 56 % T = 44 %	<i>P</i> =0,98	C = 70 % T = 30 %	<i>P</i> =0,01
<i>c.1298A&gt;C</i> <i>c.1470A&gt;C</i> rs1801131 (MTHFR)	AA = 37 (49 %) AC = 33 (44 %) CC = 5 (7 %)	A = 71 % C = 29 %	<i>P</i> =0,81	A = 64 % C = 36 %	<i>P</i> =0,08
<i>Taq I</i> <i>c.1216T&gt;C</i> rs731236 (VDR)	TT = 18 (24 %) Tt = 43 (57 %) tt = 14 (19 %)	T = 53 % t = 47 %	<i>P</i> =0,43	T = 65 % t = 35 %	<i>P</i> =0,03
<i>Apa I</i> g.59978C>A rs7975232 (VDR)	AA = 25 (20 %) Aa = 43 (57 %) aa = 7 (23 %)	A = 62 % a = 38 %	<i>P</i> =0,17	A = 58 % a = 42 %	<i>P</i> =0,34
<i>Bsm I</i> g.58980G>A rs1544410 (VDR)	BB = 21 (28 %) Bb = 35 (47 %) bb = 19 (25 %)	B = 51 % b = 49 %	<i>P</i> =0,85	B = 50 % b = 50 %	<i>P</i> =0,65
<i>Fok I</i> <i>c.162G&gt;A</i> rs10735810 (VDR)	FF = 23 (31 %) Ff = 42 (56 %) ff = 10 (13 %)	F = 59 % f = 41 %	<i>P</i> =0,41	F = 56 % f = 44 %	<i>P</i> =0,31
<i>Sp1</i> g.1252G>T rs1800012 (COL1A1)	SS = 33 (44 %) Ss = 37 (49 %) ss = 5 (7 %)	S = 69 % s = 31 %	<i>P</i> =0,45	S = 80 % s = 20 %	<i>P</i> =0,02
<i>Alu I</i> <i>c.1516C&gt;T</i> rs1801197 (CALCR)	AA = 3 (4 %) Aa = 25 (33 %) aa = 47 (63 %)	A = 21 % a = 79 %	<i>P</i> =0,99	A = 25 % a = 75 %	<i>P</i> =0,63

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes polimorfismos en la población estudiada (75 pacientes). \* Frecuencias genotípicas poblacionales de individuos sanos europeos de raza blanca obtenidos de la bibliografía. *P* (H-W) corresponde a la probabilidad relacionada con el equilibrio de Hardy-Weinberg.



## **5.6 EVOLUCIÓN EN LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS SEGÚN LOS GENOTIPOS DE CADA POLIMORFISMO EN ESTUDIO**

Para realizar una valoración de las fluctuaciones de las concentraciones de los marcadores óseos a lo largo del tiempo, se calcularon las áreas globales bajo la curva (AUC) desde los meses previos a la intervención hasta el mes (12 – 18) posterior a la cirugía. Puesto que los marcadores óseos presentan valores elevados en el hiperparatiroidismo primario, y su evolución tras el tratamiento quirúrgico es descendente, una mayor AUC indica una peor (más lenta) recuperación del estado óseo.

Se compararon las AUC medianas entre los genotipos de cada polimorfismo, para ver si existía relación entre las variantes analizadas y la evolución de los marcadores óseos. Previamente, se habían comparado: 1) las concentraciones medianas correspondientes a los meses previos a la intervención quirúrgica entre los genotipos de un mismo polimorfismo, para comprobar que los pacientes partieran de una situación inicial homogénea con independencia del genotipo y, 2) las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos en función del sexo, para comprobar la homogeneidad de su distribución entre hombres y mujeres.

Debido a la escasa representación de algunos genotipos (AA del polimorfismo *Alu I* del CTR y ss del polimorfismo *Sp1*) se tuvieron que agrupar los homocigotos minoritarios con los heterocigotos (AA+Aa y Ss+ss, respectivamente). Por otro lado, en función de las diferentes AUC correspondientes a cada genotipo y para cada marcador óseo, se realizaron agrupaciones entre los genotipos que presentaron áreas globales bajo la curva similares siguiendo criterios estadísticos y visuales.

### 5.6.1 Fosfatasa alcalina

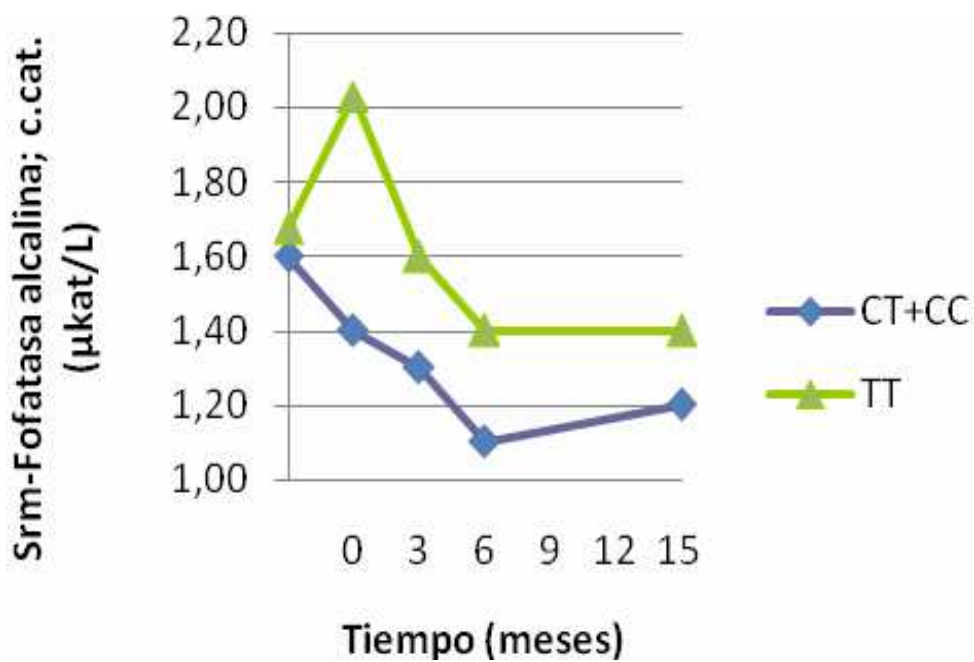
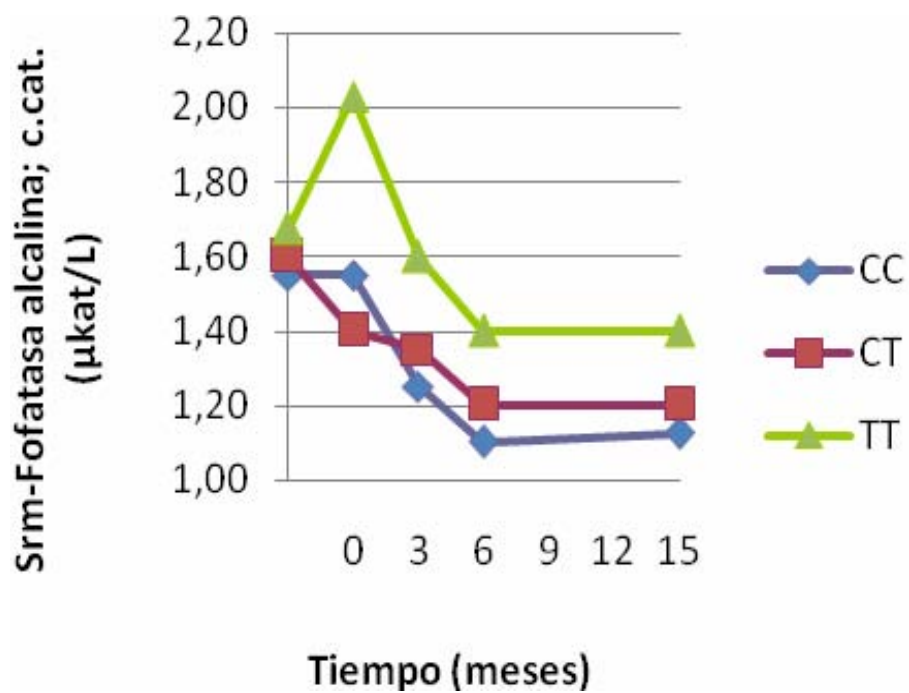
En la Tabla 10 pueden observarse los diferentes valores medianos de AUC, junto con el resultado de la prueba estadística, que demuestran la ausencia de diferencias entre ellas, al igual que las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores medianos de las áreas globales bajo la curva obtenidas entre alguno de los genotipos y las diferentes agrupaciones genotípicas para los polimorfismos en estudio, excepto para la agrupación genotípica CC+CT y el genotipo TT del polimorfismo *C677T* del gen de MTHFR ( $p = 0,0278$ ). No se realizaron agrupaciones para los genotipos de los polimorfismos *Bsm I* y *Fok I* del VDR ya que las áreas globales bajo la curva obtenidas fueron similares para los genotipos en homocigosis (BB y bb; y FF y ff, respectivamente).

Polimorfismo	Genotipo	Área global ( $\mu\text{kat/L} \cdot \text{mes}$ )	<i>P</i> Kruskal- Wallis	Genotipo agrupado	Área global agrupada ( $\mu\text{kat/L} \cdot \text{mes}$ )	<i>P</i> U-Mann Whitney
<i>C677T</i>	CC CT TT	20,5 (17,3 – 26,0) 21,9 (20,0 – 28,2) 25,2 (21,3 – 39,9)	0,0537	CC+CT TT	21,9 (19,6 – 25,2) 25,2 (21,3 – 39,9)	0,0278
<i>A1298C</i>	AA AC CC	25,0 (20,9 – 28,0) 22,1 (19,3 – 28,0) 20,1 (17,0 – 24,5)	0,3479	CC+AC AA	22,0 (19,3 – 27,0) 25,0 (20,9 – 28,0)	0,1948
<i>Taq I</i>	TT Tt tt	20,9 (19,1 – 26,9) 23,1 (20,4 – 25,8) 27,9 (17,7 – 36,4)	0,3066	TT+Tt tt	21,9 (20,3 – 25,0) 27,9 (17,7 – 36,4)	0,1702
<i>Apa I</i>	AA Aa aa	25,1 (20,2 – 27,9) 21,9 (19,4 – 28,0) 20,9 (18,9 – 32,8)	0,6989	Aa+aa AA	21,9 (20,2 – 25,8) 25,1 (20,2 – 27,9)	0,4067
<i>Bsm I</i>	BB Bb bb	23,6 (18,3 – 33,0) 22,1 (19,5 – 25,5) 23,1 (20,1 – 35,8)	0,6009	-	-	-
<i>Fok I</i>	FF Ff ff	24,7 (20,1 – 30,5) 21,6 (19,3 – 26,3) 23,1 (15,5 – 42,7)	0,7080	-	-	-
<i>Sp1</i>	SS Ss ss	-	-	SS Ss + ss	22,0 (18,9 – 27,2) 23,1 (20,7 – 28,0)	0,3812
<i>Alu I</i>	AA Aa aa	-	-	AA+Aa aa	24,6 (19,7 – 30,4) 21,6 (20,3 – 26,7)	0,5592

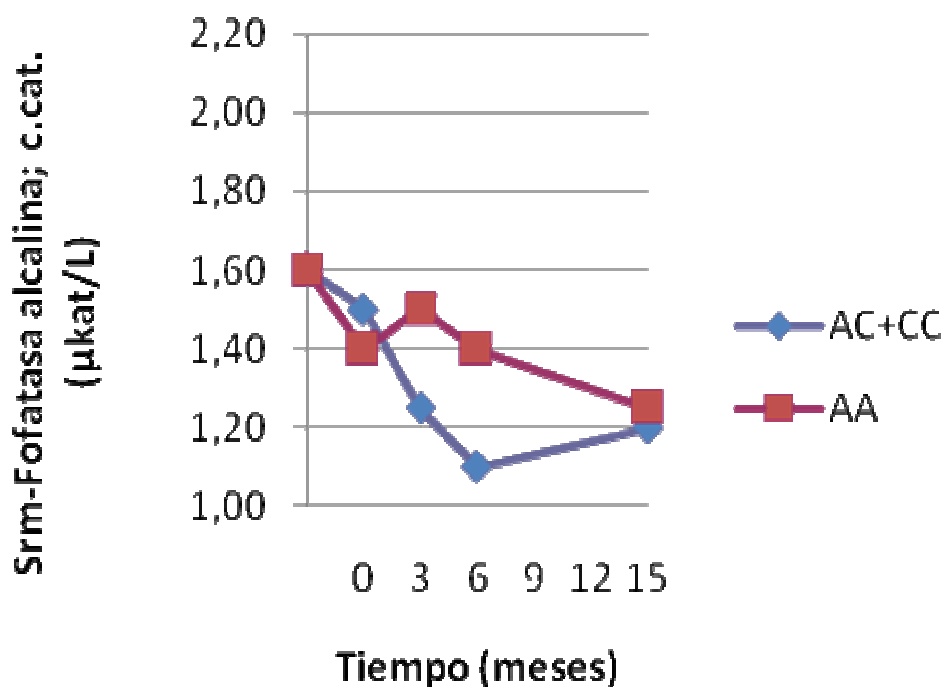
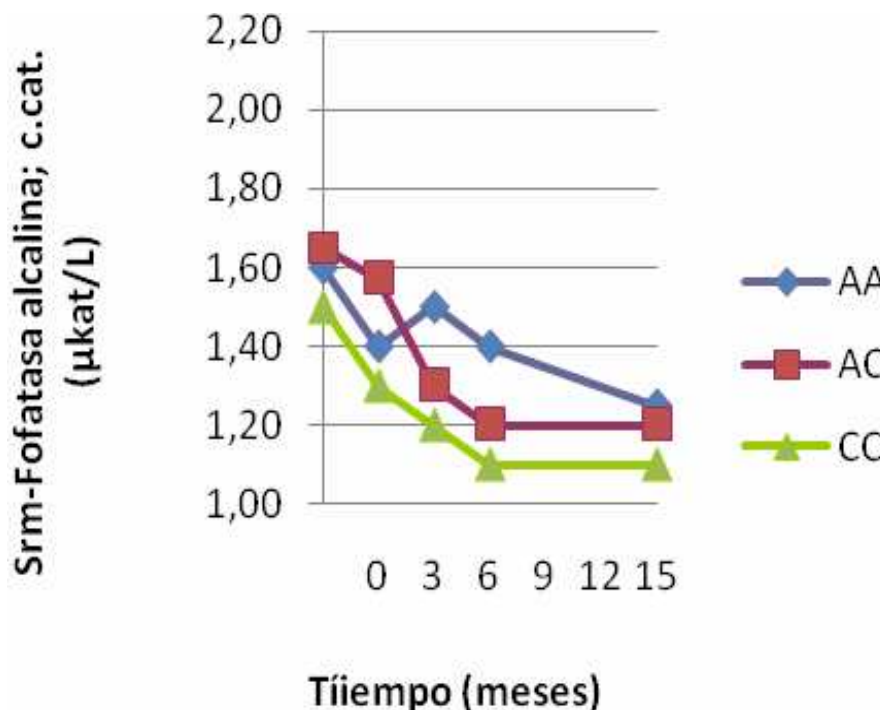
**Tabla 10.** Valores medianos de las áreas globales bajo la curva para la fosfatasa alcalina obtenidas para cada uno de los genotipos de los polimorfismos en estudio, así como los valores obtenidos para las diferentes agrupaciones realizadas acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

En las siguientes figuras, puede observarse la evolución de las concentraciones de fosfatasa alcalina en función de los genotipos de los diversos polimorfismos así como la agrupación de los mismos.

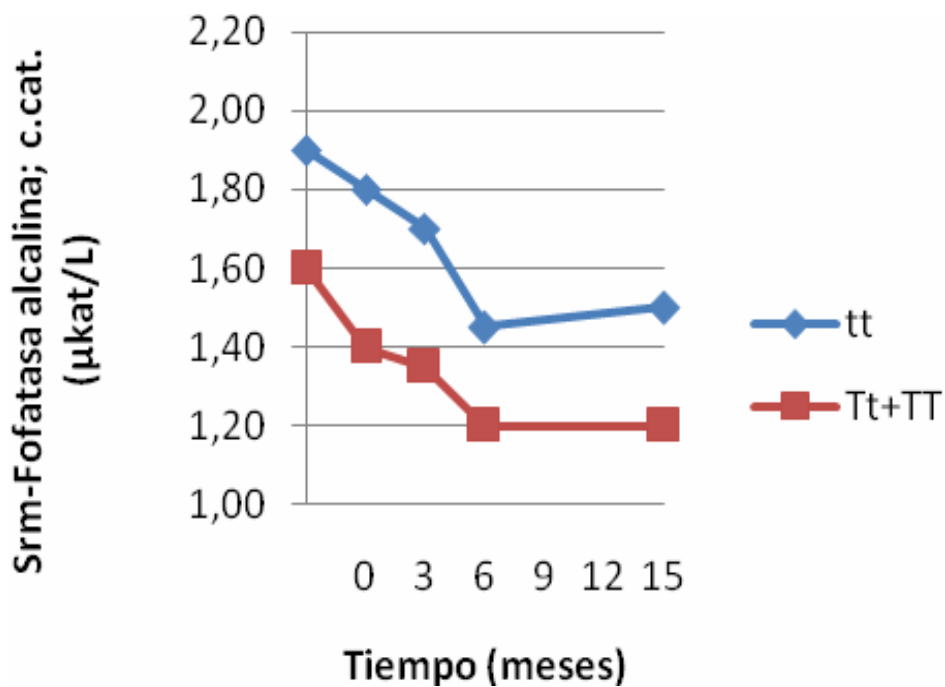
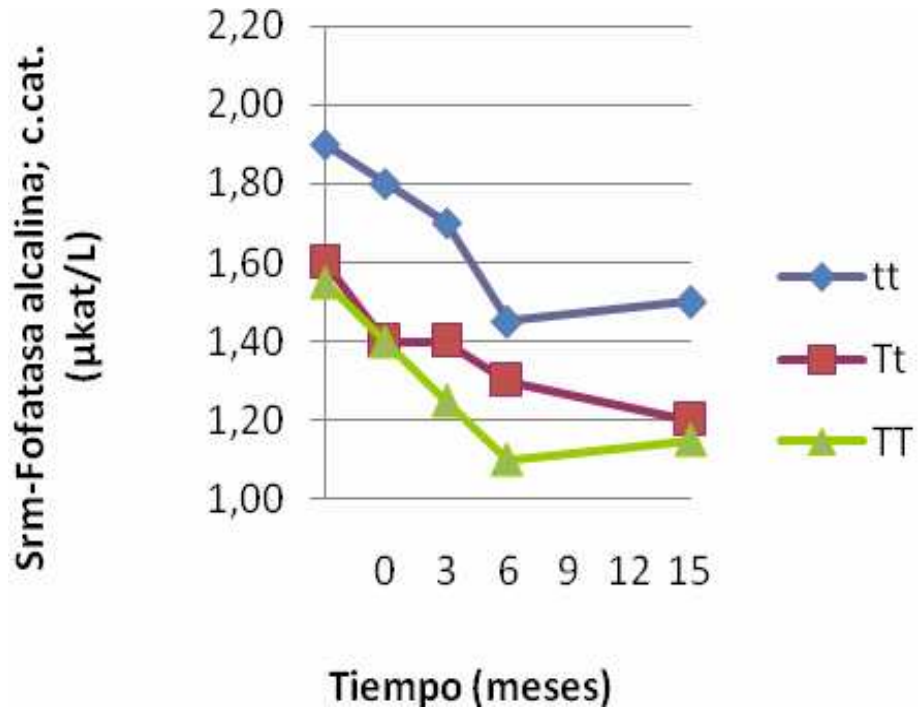
Polimorfismo C677T del gen de la MTHFR



Polimorfismo A1298C del gen de la MTHFR



Polimorfismo *Taq I* del gen del VDR



### 5.6.2 C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I

En la Tabla 11 pueden observarse los diferentes valores medianos de AUC, junto con el resultado de la prueba estadística que demuestran la ausencia de diferencias entre ellas, al igual que las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores medianos de las áreas globales bajo la curva obtenidas entre alguno de los genotipos y las diferentes agrupaciones genotípicas para los polimorfismos en estudio, excepto para la agrupación genotípica AC+CC y el genotipo AA del polimorfismo *A1298C* del gen de *MTHFR* ( $p = 0,0351$ ). No se realizaron agrupaciones para los genotipos del polimorfismo *Bsm I* del *VDR* ya que las áreas globales bajo la curva obtenidas fueron similares para los genotipos en homocigosis (BB y bb).

## Resultados

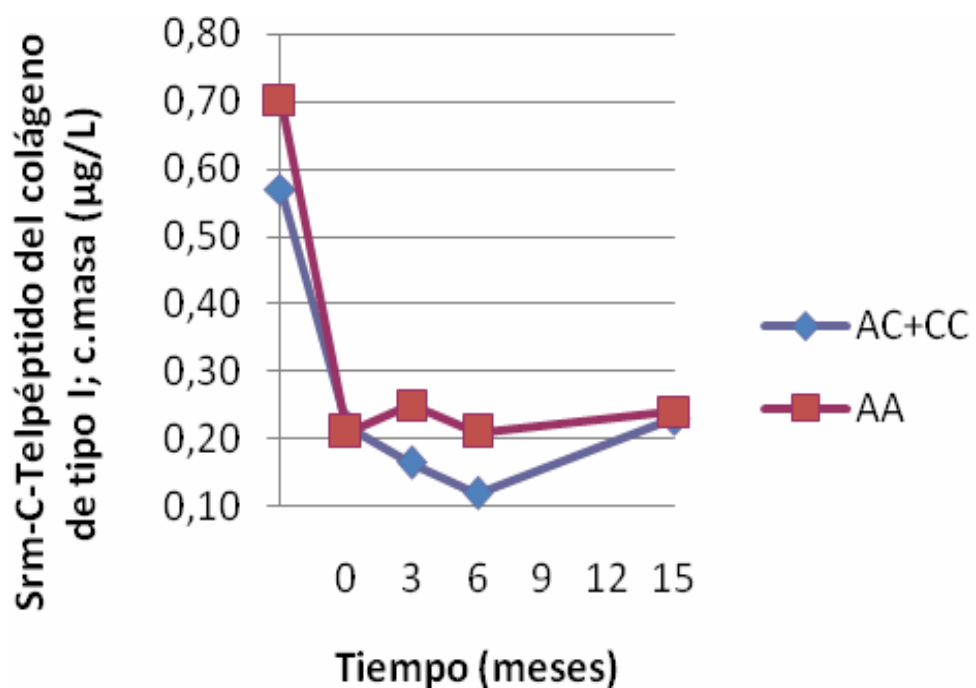
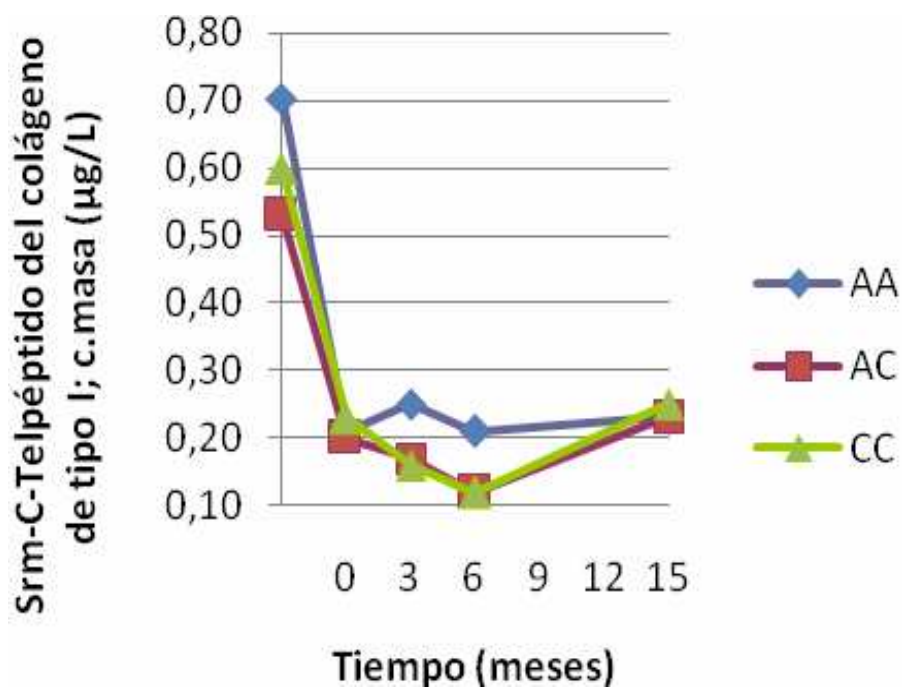
Polimorfismo	Genotipo	Área global (µg/L · mes)	P Kruskal -Wallis	Genotipo agrupado	Área global agrupada (µkat/L · mes)	P U-Mann Whitney
<i>C677T</i>	CC CT TT	3,85 (2,35 – 5,05) 4,26 (2,90 – 6,48) 5,95 (2,26 – 11,33)	0,4149	CC+CT TT	4,05 (2,99 – 4,92) 5,95 (2,26 – 11,33)	0,2403
<i>A1298C</i>	AA AC CC	4,97 (3,64 – 6,43) 3,15 (2,20 – 5,05) 3,41 (2,16 – 4,58)	0,1551	CC+AC AA	3,28 (2,33 – 4,87) 4,97 (3,64 – 6,43)	0,0351
<i>Taq I</i>	TT Tt tt	3,42 (2,14 – 6,71) 4,06 (2,62 – 5,33) 4,76 (2,59 – 10,34)	0,7365	TT+Tt tt	3,96 (2,81 – 5,25) 4,76 (2,59 – 10,34)	0,5114
<i>Apa I</i>	AA Aa aa	5,09 (2,79 – 6,41) 3,83 (2,60 – 5,06) 3,63 (1,21 – 6,42)	0,5323	Aa+aa AA	3,83 (2,63 – 4,95) 5,09 (2,79 – 6,41)	0,3282
<i>Bsm I</i>	BB Bb bb	4,76 (2,55 – 10,66) 3,83 (2,59 – 5,13) 4,89 (3,34 – 7,50)	0,3776	-	-	-
<i>Fok I</i>	FF Ff ff	3,31 (2,34 – 4,30) 4,60 (2,96 – 6,11) 5,60 (2,90 – 9,67)	0,1753	FF+Ff ff	3,96 (2,99 – 4,98) 5,60 (2,90 – 9,67)	0,1072
<i>Sp1</i>	SS Ss ss			SS Ss + ss	3,78 (2,90 – 6,46) 4,41 (2,50 – 5,33)	0,8210
<i>Alu I</i>	AA Aa aa			AA+Aa aa	4,16 (2,69 – 5,70) 4,14 (2,59 – 5,52)	0,4834

**Tabla 11.** Valores medianos de las áreas globales bajo la curva para el CTx obtenidas para cada uno de los genotipos de los polimorfismos en estudio, así como los valores obtenidos para las diferentes agrupaciones realizadas acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

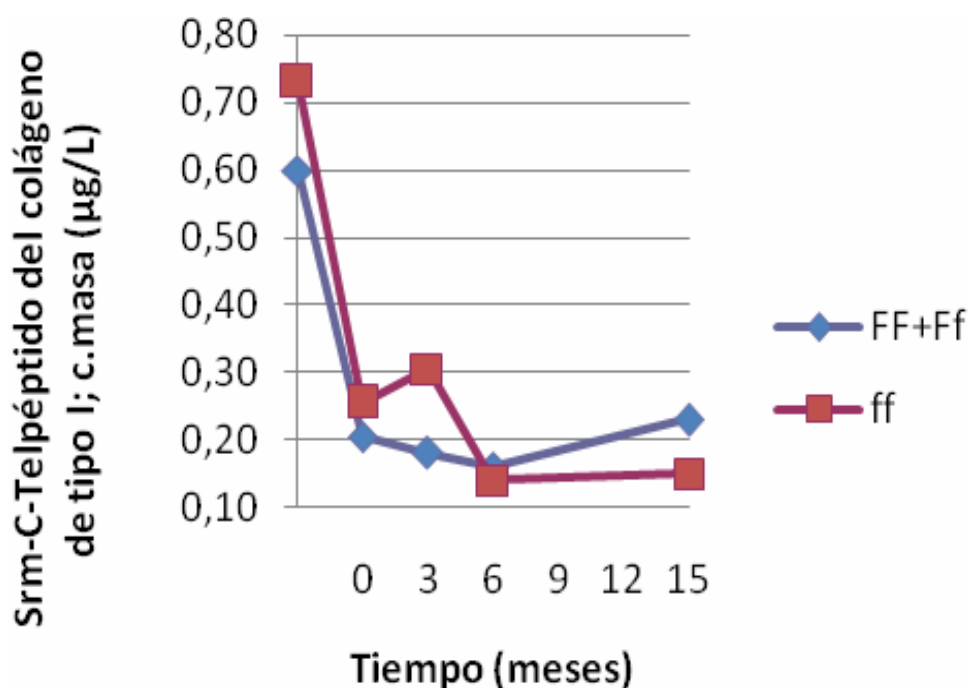
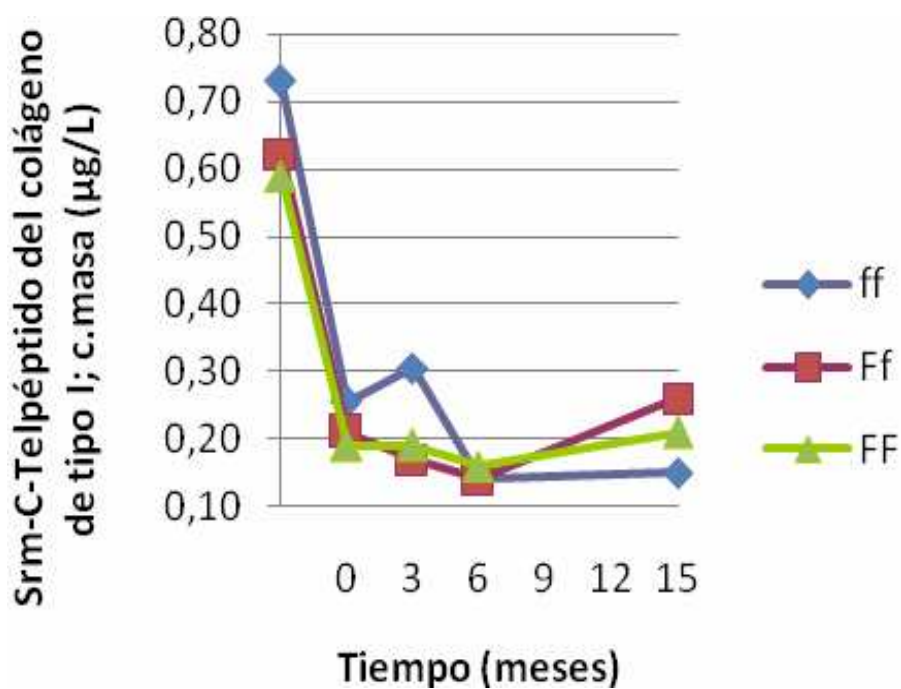
En las siguientes figuras, puede observarse la evolución de las concentraciones de CTx en función de los genotipos de los diversos polimorfismos así como la agrupación de los mismos.



Polimorfismo A1298C del gen de la MTHFR



Polimorfismo *Fok I* del gen del VDR



### 5.6.3 Osteocalcina

En la Tabla 12 pueden observarse los diferentes valores medianos de AUC, junto con el resultado de la prueba estadística que demuestran la ausencia de diferencias entre ellas, al igual que las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores medianos de las áreas globales bajo la curva obtenidas entre alguno de los genotipos y las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas para los polimorfismos en estudio, excepto para la agrupación genotípica TT+Tt y el genotipo tt del polimorfismo *Taq I* del gen del VDR ( $p = 0,0416$ ). No se realizaron agrupaciones para los genotipos del polimorfismo *Bsm I* del VDR ya que las áreas globales bajo la curva obtenidas fueron similares para los genotipos en homocigosis (BB y bb).

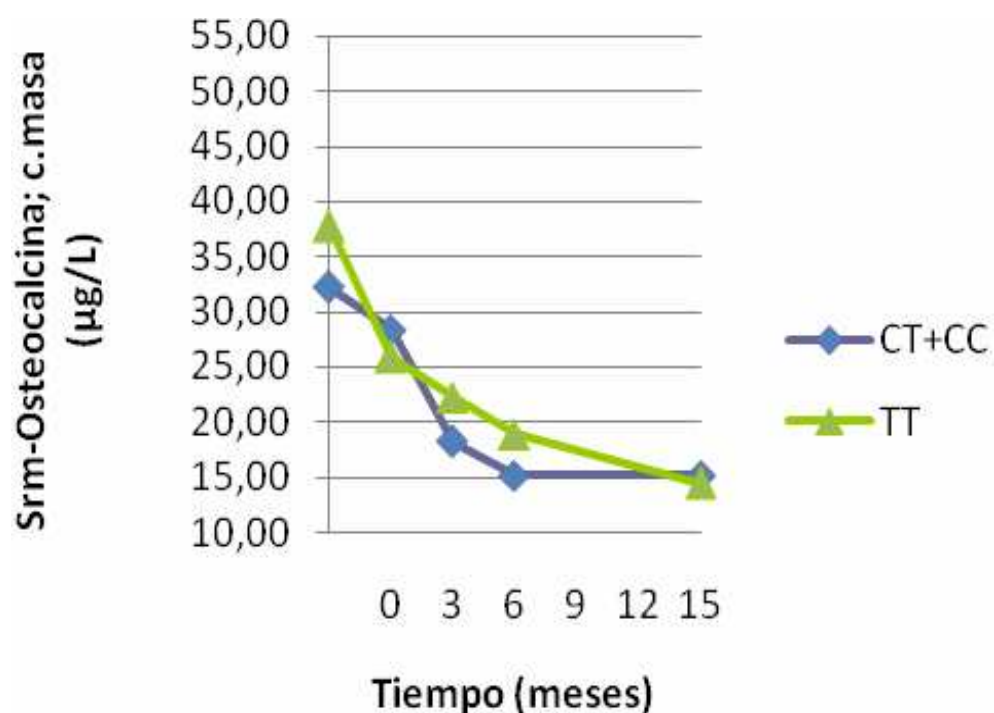
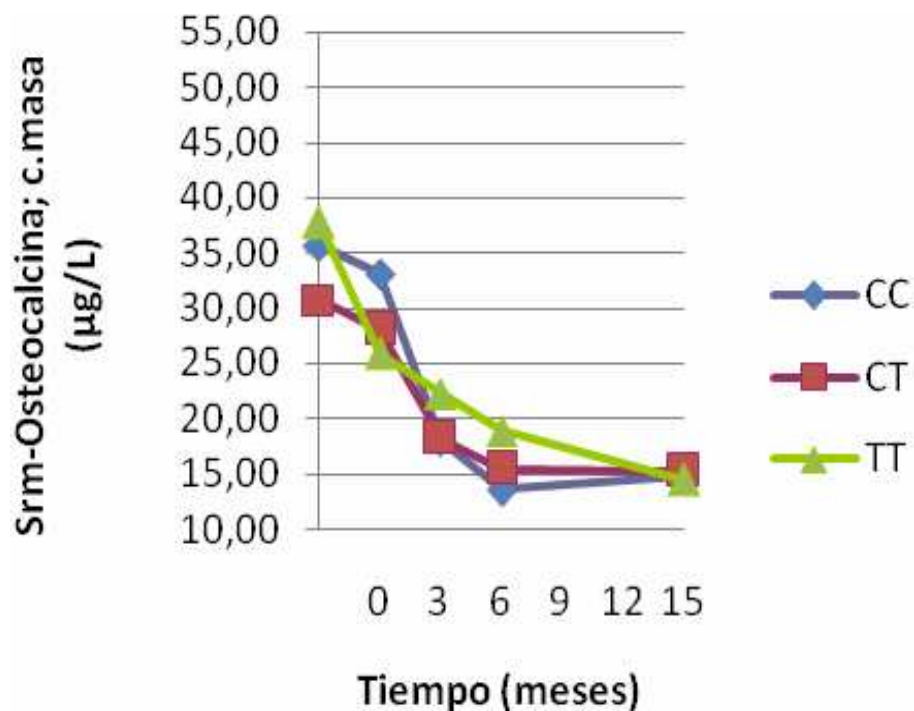
## Resultados

Polimorfismo	Genotipo	Área global (µg/L · mes)	P Kruskal -Wallis	Genotipo agrupado	Área global agrupada (µkat/L · mes)	P U-Mann Whitney
<i>C677T</i>	CC CT TT	308,0 (249,4 – 381,1) 323,4 (289,3 – 385,4) 379,2 (264,1 – 491,2)	0,2815	CC+CT TT	314,5 (290,4 – 372,9) 379,2 (264,1 – 491,2)	0,1799
<i>A1298C</i>	AA AC CC	349,5 (301,4 – 388,4) 316,3 (254,1 – 395,9) 320,0 (264,1 – 391,2)	0,5322	CC+AC AA	318,1 (264,7 – 387,2) 349,5 (301,4 – 388,4)	0,2639
<i>Taq I</i>	TT Tt tt	319,8 (265,3 – 391,3) 321,2 (285,4 – 376,0) 397,0 (308,7 – 515,3)	0,1256	TT+Tt tt	319,8 (289,8 – 375,3) 397,0 (308,7 – 515,3)	0,0416
<i>Apa I</i>	AA Aa aa	376,3 (302,5 – 467,1) 318,1 (271,5 – 380,4) 311,3 (189,3 – 340,5)	0,1070	Aa+aa AA	314,5 (279,1 – 363,3) 376,3 (302,5 – 467,1)	0,1005
<i>Bsm I</i>	BB Bb bb	375,9 (287,6 – 495,7) 310,4 (261,0 – 376,3) 346,5 (292,1 – 458,9)	0,2238	-	-	-
<i>Fok I</i>	FF Ff ff	318,1 (247,6 – 376,1) 340,5 (296,6 – 394,7) 375,9 (248,4 – 550,5)	0,4721	FF+Ff ff	329,6 (300,7 – 376,1) 375,9 (248,4 – 550,5)	0,2261
<i>Sp1</i>	SS Ss ss	-	-	SS Ss + ss	330,5 (277,7 – 391,1) 335,0 (299,1 – 379,6)	0,8437
<i>Alu I</i>	AA Aa aa	-	-	AA+Aa aa	357,6 (290,7 – 403,4) 326,5 (289,1 – 381,7)	0,5346

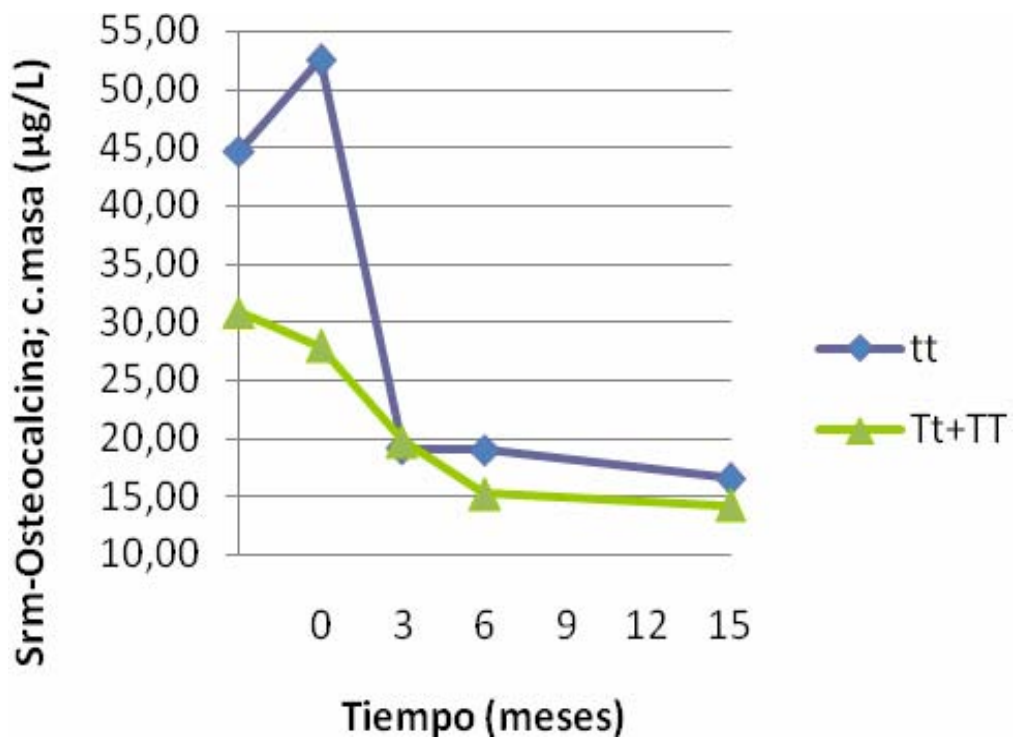
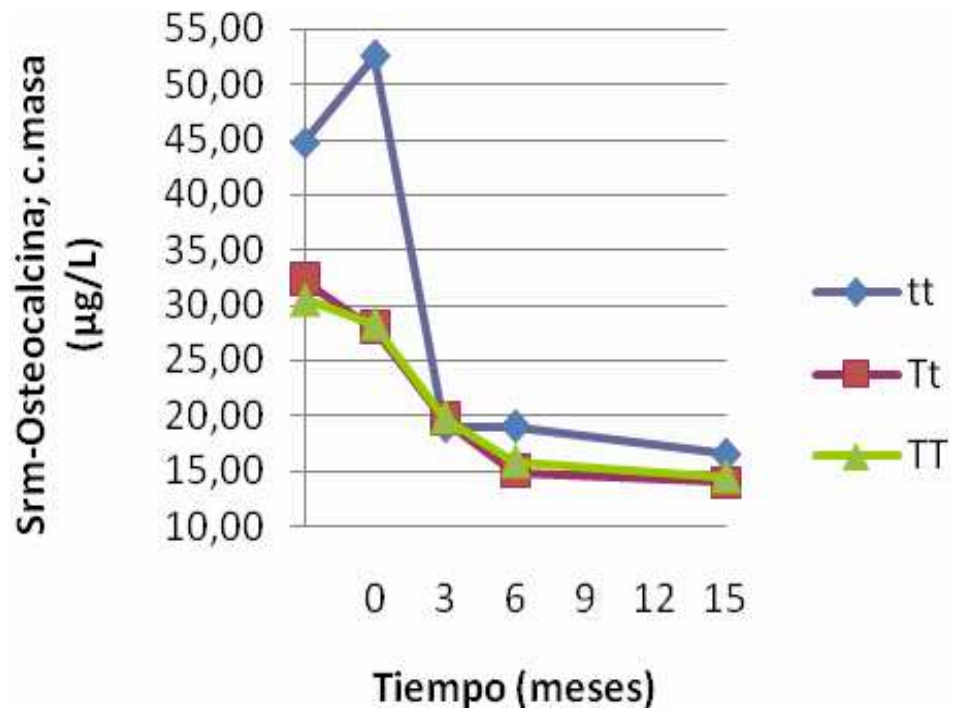
**Tabla 12.** Valores medianos de las áreas globales bajo la curva para la osteocalcina obtenidas para cada uno de los genotipos de los polimorfismos en estudio, así como los valores obtenidos para las diferentes agrupaciones realizadas acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

En las siguientes figuras, puede observarse la evolución de las concentraciones de osteocalcina en función de los genotipos de los diversos polimorfismos así como la agrupación de los mismos.

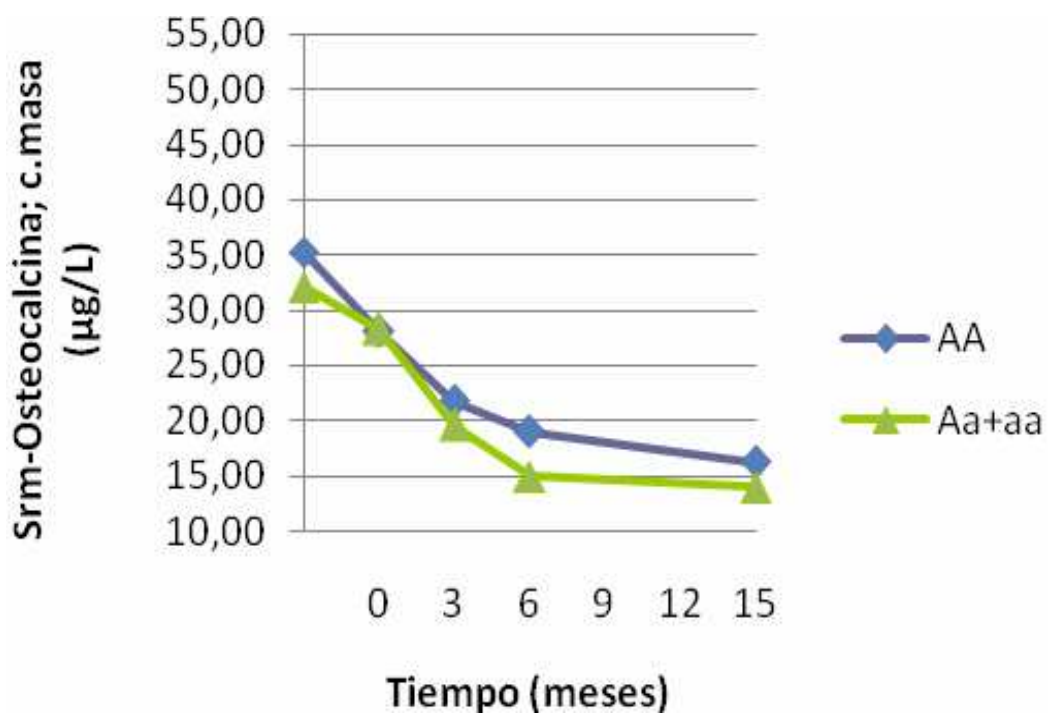
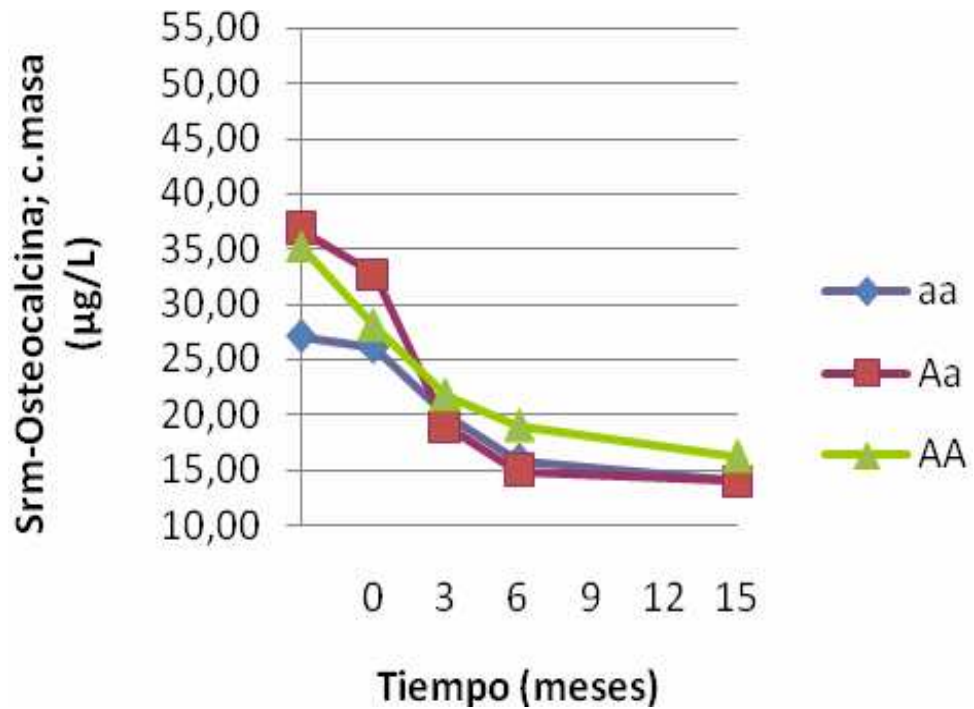
Polimorfismo C677T del gen de la MTHFR



Polimorfismo *Taq I* del gen del VDR



Polimorfismo *Apa I* del gen del VDR



## **5.7 EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA SEGÚN LOS GENOTIPOS DE CADA POLIMORFISMO EN ESTUDIO**

Se realizó un seguimiento evolutivo de la densidad mineral ósea (aumento o ascenso relativo) en la zona lumbar y en la cadera, en función de los genotipos de los diversos polimorfismos desde los meses previos a la intervención hasta el mes (12 – 18) posterior a la intervención. Al igual que se realizó para los diferentes marcadores óseos, previamente se compararon las densidades minerales óseas anteriores a la intervención quirúrgica para cada uno de los genotipos de un mismo polimorfismo, para comprobar que los pacientes partieran de una situación inicial homogénea con independencia del genotipo, y las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos en función del sexo, para comprobar la homogeneidad de su distribución entre hombres y mujeres.

Posteriormente, se realizó para cada polimorfismo en estudio, una agrupación de los diferentes genotipos que presentaron aumentos relativos similares en la densidad mineral ósea, a excepción de los genotipos AA del polimorfismo *Alu I* del CTR y ss del polimorfismo *Sp1* del COL1A1, los cuales se agruparon como AA+Aa y Ss+ss, respectivamente, en función del tamaño muestral.

### **5.7.1 Densidad mineral ósea en la zona lumbar**

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores medianos de los aumentos relativos obtenidos entre alguno de los genotipos y las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas para los polimorfismos en estudio (Tabla 13). Así y todo, para la agrupación genotípica CT+TT y el genotipo CC del polimorfismo *C677T* del gen de la MTHFR, las diferencias entre los aumentos relativos rozaron la significación estadística ( $p = 0,0588$ ). No se realizaron



agrupaciones para los genotipos de los polimorfismos *Taq I* y *Fok I* del VDR, ya que los aumentos relativos obtenidos fueron similares para los genotipos en homocigosis (TT y tt; FF y ff, respectivamente).

Polimorfismo	Genotipo	Ascenso relativo (%)	<i>P</i> Kruskal -Wallis	Genotipo agrupado	Ascenso relativo agrupado (%)	<i>P</i> U-Mann Whitney
<i>C677T</i>	CC	5,71 (2,72 – 9,71)	0,1335	CT+TT CC	1,96 (1,12 – 5,42) 5,71 (2,72 – 9,71)	0,0588
	CT	2,32 (0,92 – 7,70)				
	TT	1,68 (-1,14 – 6,98)				
<i>A1298C</i>	AA	3,07 (0,77 – 7,88)	0,7038	AC+CC AA	4,52 (1,68 – 6,90) 3,07 (0,77 – 7,88)	0,4063
	AC	4,52 (1,66 – 7,25)				
	CC	4,29 (0,37 – 10,41)				
<i>Taq I</i>	TT	3,10 (0,83 – 7,21)	0,9012	-	-	-
	Tt	3,94 (1,52 – 7,62)				
	tt	3,06 (-0,37 – 10,15)				
<i>Apa I</i>	AA	4,25 (-0,03 – 8,17)	0,1964	AA+Aa aa	4,16 (1,94 – 6,02) 0,54 (0,11 – 13,6)	0,0947
	Aa	4,16 (1,69 – 7,22)				
	aa	0,54 (0,11 – 13,6)				
<i>Bsm I</i>	BB	3,80 (0,08 – 7,52)	0,3443	BB+Bb bb	3,71 (1,69 – 5,87) 2,11 (0,24 – 8,70)	0,3760
	Bb	3,71 (1,70 – 8,90)				
	bb	2,11 (0,24 – 8,70)				
<i>Fok I</i>	FF	3,71 (1,48 – 12,65)	0,2081	-	-	-
	Ff	3,05 (0,91 – 5,71)				
	ff	3,70 (1,02 – 16,16)				
<i>Sp1</i>	SS	-	-	SS Ss+ss	3,40 (1,14 – 8,49) 3,71 (1,40 – 6,15)	0,9767
	Ss	-				
	ss	-				
<i>Alu I</i>	AA	-	-	AA+Aa aa	4,16 (1,79 – 7,25) 3,07 (1,12 – 6,18)	0,7470
	Aa	-				
	aa	-				

**Tabla 13.** Valores medianos de los aumentos relativos obtenidos para la DMO en la zona lumbar de cada uno de los genotipos de los polimorfismos en estudio, así como los valores obtenidos para las diferentes combinaciones realizadas acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

### 5.7.2 Densidad mineral ósea en la zona de la cadera

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores medianos de los aumentos relativos obtenidos entre alguno de los genotipos y las diferentes agrupaciones genotípicas realizadas para los polimorfismos en estudio

(Tabla 14). Así y todo, para la agrupación genotípica CT+TT y el genotipo CC del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR, las diferencias entre los aumentos relativos rozaron la significación estadística ( $p = 0,0630$ ). No se realizaron agrupaciones para los genotipos de los polimorfismos A1298C de la MTHFR y Taq I, Apa I, Bsm I y Fok I del VDR, ya que los aumentos relativos obtenidos fueron similares para los genotipos en homocigosis (AA y CC; TT y tt; AA y aa; BB y bb y FF y ff, respectivamente).

Polimorfismo	Genotipo	Ascenso relativo (%)	P Kruskal-Wallis	Genotipo agrupado	Ascenso relativo agrupado (%)	P U-Mann Whitney
C677T	CC CT TT	5,88 (3,18 – 10,30) 3,13 (0,84 – 8,42) 2,27 (0,24 – 7,91)	0,1654	CT+TT CC	3,39 (0,98 – 6,50) 5,88 (3,18 – 10,30)	0,0630
A1298C	AA AC CC	5,24 (1,74 – 6,41) 4,98 (0,98 – 9,82) 5,17 (2,53 – 11,69)	0,6332	-	-	-
Taq I	TT Tt tt	4,93 (0,26 – 8,82) 5,79 (2,49 – 8,04) 3,24 (0,88 – 12,08)	0,7852	-	-	-
Apa I	AA Aa aa	3,45 (1,40 – 6,44) 5,96 (2,92 – 9,33) 1,07 (-0,47 – 15,73)	0,1357	-	-	-
Bsm I	BB Bb bb	3,19 (0,97 – 6,10) 6,64 (4,96 – 9,07) 2,63 (0,14 – 8,31)	0,0879	-	-	-
Fok I	FF Ff ff	7,62 (2,37 – 11,06) 3,24 (1,35 – 5,85) 5,94 (0,30 – 13,86)	0,0694	-	-	-
Sp1	SS Ss ss	-	-	SS Ss+ss	5,77 (2,49 – 8,41) 4,87 (1,74 – 6,84)	0,8602
Alu I	AA Aa aa	-	-	AA+Aa aa	6,47 (2,74 – 9,03) 4,19 (1,45 – 5,99)	0,2235

**Tabla 14.** Valores medianos de los aumentos relativos obtenidos para la DMO en la zona de la cadera de cada uno de los genotipos de los polimorfismos en estudio, así como los valores obtenidos para las diferentes combinaciones realizadas acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

## **5.8 INTERACCIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE DIFERENTES POLIMORFISMOS EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS MARCADORES ÓSEOS**

Una vez conocida la evolución de las concentraciones de los marcadores óseos en función de los diferentes genotipos de los polimorfismos estudiados, se pudieron identificar tanto los genotipos como los alelos asociados a una mayor AUC, es decir a una peor estabilización o más lenta normalización de las concentraciones de marcadores óseos tras el tratamiento quirúrgico (alelos de peor evolución). Posteriormente, se estudió la influencia conjunta de estos alelos. Para ello, se generó una nueva variable: el número de alelos de peor evolución que porta cada paciente. Esta nueva variable se clasificó como: presencia de 2 ó menos alelos y presencia de 3 ó 4 alelos.

Previamente, se comprobó si existía una asociación entre los diferentes polimorfismos genéticos en estudio, es decir, si sus distribuciones genotípicas no se comportaban de manera independiente. Se encontraron las siguientes asociaciones entre polimorfismos:

- *C677T* del gen de la MTHFR con *A1298C* del gen de la MTHFR,
- *A1298C* del gen de la MTHFR con *Alu I* del gen del CTR,
- *Bsm I* del gen del VDR con *Taq I* del gen del VDR,
- *Bsm I* del gen del VDR con *Apa I* del gen del VDR,
- *Apa I* del gen del VDR con *Taq I* del gen del VDR,

En todos estos casos, no se realizó el estudio de influencia conjunta de los alelos de peor evolución.

### 5.8.1 Fosfatasa alcalina

Los alelos identificados con una más lenta estabilización de las concentraciones de fosfatasa alcalina (mayores AUC) fueron: **T** para el polimorfismo *C677T*, **A** para el polimorfismo *A1298C*, **t** para el polimorfismo *Taq I*, **A** para el polimorfismo *Apa I*, **s** para el polimorfismo *Sp1* y **A** del polimorfismo *Alu I*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las AUC entre los portadores de más de dos alelos de peor evolución y los portadores de dos o menos alelos de peor evolución cuando, para un mismo paciente, se combinaron los alelos de los polimorfismos *C677T* y *Taq I* y los polimorfismos *C677T* y *Apa I* (Tabla 15).

Polimorfismos agrupados	Alelos de peor recuperación	Nº de alelos de peor recuperación	Área global ( $\mu\text{kat/L} \cdot \text{mes}$ )	P U-Mann-Whitney
<i>C677T-Taq I</i>	T-t	> 2	26,9 (21,9 – 36,7)	0,0108
		$\leq$ 2	20,9 (20,0 – 24,8)	
<i>C677T-Apa I</i>	T-A	> 2	26,9 (21,9 – 36,7)	0,0179
		$\leq$ 2	20,9 (19,6 – 24,8)	
<i>C677T-Sp1</i>	T-s	> 2	23,4 (20,9 – 27,7)	0,8325
		$\leq$ 2	22,5 (19,4 – 26,0)	
<i>C677T-Alu I</i>	T-A	> 2	24,9 (21,2 – 29,8)	0,1423
		$\leq$ 2	20,9 (18,9 – 26,0)	
<i>A1298C-Taq I</i>	A-t	> 2	25,2 (20,9 – 29,6)	0,2609
		$\leq$ 2	21,3 (20,1 – 24,7)	
<i>A1298C-Apa I</i>	A-A	> 2	25,1 (20,9 – 27,7)	0,4010
		$\leq$ 2	21,3 (19,6 – 24,8)	
<i>A1298C-Sp1</i>	A-s	> 2	22,1 (20,9 – 26,9)	0,8325
		$\leq$ 2	23,1 (19,4 – 28,0)	
<i>Taq I-Sp1</i>	t-s	> 2	24,8 (18,8 – 28,1)	0,4854
		$\leq$ 2	21,9 (20,4 – 25,2)	
<i>Taq I-Alu I</i>	t-A	> 2	24,9 (20,9 – 32,8)	0,1836
		$\leq$ 2	21,2 (20,0 – 25,2)	
<i>Apa I-Sp1</i>	A-s	> 2	23,1 (20,0 – 26,0)	0,4854
		$\leq$ 2	21,9 (20,2 – 29,6)	
<i>Apa I-Alu I</i>	A-A	> 2	24,9 (20,9 – 28,0)	0,2106
		$\leq$ 2	20,9 (19,4 – 26,0)	
<i>Sp1-Alu I</i>	s-A	> 2	21,6 (15,5 – 26,9)	0,1877
		$\leq$ 2	22,6 (20,9 – 27,7)	

**Tabla 15.** Valores medianos de las AUC para la fosfatasa alcalina tras la combinación de los diferentes alelos de los diferentes polimorfismos acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

### 5.8.2 C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I

Los alelos identificados con una más lenta estabilización de las concentraciones de CTx (mayores AUC) fueron el: **T** para el polimorfismo *C677T*, **A** para el polimorfismo *A1298C*, **t** para el polimorfismo *Taq I*, **A** para el polimorfismo *Apa I*, **f** para el polimorfismo *Fok I*, **s** para el polimorfismo *Sp1* y **A** del polimorfismo *Alu I*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las AUC entre los portadores de más de dos alelos de peor evolución y los portadores de dos o menos alelos de peor evolución cuando, para un mismo paciente, se combinaron los alelos de los polimorfismos *A1298C* y *Fok I* y los polimorfismos *A1298C* y *Alu I* (Tabla 16).

Polimorfismos agrupados	Alelos de peor recuperación	Nº de alelos de peor recuperación	Área global ( $\mu\text{g/L} \cdot \text{mes}$ )	P U-Mann-Whitney
<i>C677T-Taq I</i>	T-t	> 2	5,53 (2,59 – 7,63)	0,2701
		$\leq 2$	4,04 (3,15 – 4,76)	
<i>C677T-Apa I</i>	T-A	> 2	5,54 (2,59 – 11,67)	0,1927
		$\leq 2$	4,05 (2,90 – 4,76)	
<i>C677T-Fok I</i>	T-f	> 2	6,42 (1,88 – 31,11)	0,0602
		$\leq 2$	3,83 (2,90 – 4,74)	
<i>C677T-Sp1</i>	T-s	> 2	4,16 (2,72 – 5,09)	0,6682
		$\leq 2$	3,83 (2,60 – 6,46)	
<i>C677T-Alu I</i>	T-A	> 2	3,96 (2,52 – 6,43)	0,7998
		$\leq 2$	4,36 (2,87 – 5,21)	
<i>A1298C-Taq I</i>	A-t	> 2	4,74 (3,73 – 5,60)	0,1637
		$\leq 2$	3,36 (2,40 – 5,03)	
<i>A1298C-Apa I</i>	A-A	> 2	4,74 (3,73 – 5,60)	0,1055
		$\leq 2$	3,28 (2,23 – 5,03)	
<i>A1298C-Fok I</i>	A-f	> 2	5,47 (4,41 – 6,48)	0,0172
		$\leq 2$	3,36 (2,59 – 4,36)	
<i>A1298C-Sp1</i>	A-s	> 2	4,39 (3,31 – 6,31)	0,1972
		$\leq 2$	3,28 (2,40 – 5,09)	
<i>A1298C-Alu I</i>	A-A	> 2	4,76 (3,76 – 6,39)	0,0015
		$\leq 2$	2,58 (1,52 – 4,35)	
<i>Taq I-Fok I</i>	t-f	> 2	5,03 (2,59 – 9,84)	0,3239
		$\leq 2$	3,83 (2,90 – 5,19)	
<i>Taq I-Sp1</i>	t-s	> 2	4,41 (3,20 – 9,84)	0,2016
		$\leq 2$	3,96 (2,60 – 5,19)	
<i>Taq I-Alu I</i>	t-A	> 2	4,74 (3,20 – 5,47)	0,1346
		$\leq 2$	3,58 (2,35 – 5,60)	
<i>Apa I-Fok I</i>	A-f	> 2	5,06 (2,35 – 6,46)	0,4263
		$\leq 2$	3,78 (2,90 – 4,74)	
<i>Apa I-Sp1</i>	A-s	> 2	4,14 (3,19 – 6,31)	0,4716
		$\leq 2$	4,16 (2,60 – 5,19)	
<i>Apa I-Alu I</i>	A-A	> 2	4,16 (3,20 – 5,47)	0,5006
		$\leq 2$	3,83 (2,58 – 5,31)	
<i>Fok I-Sp1</i>	f-s	> 2	4,41 (2,35 – 9,84)	0,4138
		$\leq 2$	3,95 (2,71 – 5,09)	
<i>Fok I-Alu I</i>	f-A	> 2	5,03 (2,59 – 9,84)	0,0837
		$\leq 2$	3,73 (2,71 – 4,45)	
<i>Sp1-Alu I</i>	s-A	> 2	4,61 (2,58 – 5,48)	0,8861
		$\leq 2$	3,89 (2,90 – 5,31)	

**Tabla 16.** Valores medianos de las AUC para el CTx tras la combinación de los diferentes alelos de los diferentes polimorfismos acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

### 5.8.3 Osteocalcina

Los alelos identificados con una más lenta estabilización de las concentraciones de osteocalcina (mayores AUC) fueron el: **T** para el polimorfismo *C677T*, **A** para el polimorfismo *A1298C*, **t** para el polimorfismo *Taq I*, **A** para el polimorfismo *Apa I*, **f** para el polimorfismo *Fok I*, **s** para el polimorfismo *Sp1* y **A** del polimorfismo *Alu I*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las AUC entre los portadores de más de dos alelos de peor evolución y los portadores de dos o menos alelos de peor evolución cuando, para un mismo paciente, se combinaron los polimorfismos *C677T* y *Apa I*, *A1298C* y *Apa I*, *Taq I* y *Alu I* y *Fok I* y *Alu I* (Tabla 17).

Polimorfismos agrupados	Alelos de peor recuperación	Nº de alelos de peor recuperación	Área global (µg/L · mes)	P U-Mann-Whitney
<i>C677T-Taq I</i>	T-t	> 2 ≤ 2	376,7 (343,3 – 492,0) 312,8 (290,4 – 357,8)	0,0758
<i>C677T-Apa I</i>	T-A	> 2 ≤ 2	382,5 (355,5 – 490,1) 308,0 (284,1 – 340,5)	0,0104
<i>C677T-Fok I</i>	T-f	> 2 ≤ 2	382,5 (263,1 – 492,6) 316,3 (290,4 – 361,2)	0,1296
<i>C677T-Sp1</i>	T-s	> 2 ≤ 2	349,5 (300,4 – 409,8) 310,4 (284,1 – 376,7)	0,4365
<i>C677T-Alu I</i>	T-A	> 2 ≤ 2	368,6 (323,4 – 409,8) 307,2 (265,6 – 376,7)	0,1012
<i>A1298C-Taq I</i>	A-t	> 2 ≤ 2	357,6 (301,6 – 409,8) 316,3 (265,6 – 381,5)	0,1540
<i>A1298C-Apa I</i>	A-A	> 2 ≤ 2	361,2 (301,6 – 417,3) 312,8 (264,1 – 340,5)	0,0315
<i>A1298C-Fok I</i>	A-f	> 2 ≤ 2	355,5 (301,6 – 382,5) 312,8 (225,4 – 376,2)	0,0611
<i>A1298C-Sp1</i>	A-s	> 2 ≤ 2	335,0 (268,2 – 399,1) 332,0 (297,5 – 376,0)	0,7976
<i>Taq I-Fok I</i>	t-f	> 2 ≤ 2	396,6 (263,1 – 524,4) 325,0 (297,5 – 376,0)	0,1399
<i>Taq I-Sp1</i>	t-s	> 2 ≤ 2	368,6 (290,4 – 417,3) 319,8 (284,1 – 376,0)	0,1767
<i>Taq I-Alu I</i>	t-A	> 2 ≤ 2	376,0 (308,0 – 417,3) 312,8 (268,2 – 343,4)	0,0363
<i>Apa I-Fok I</i>	A-f	> 2 ≤ 2	375,9 (290,4 – 457,7) 323,4 (290,4 – 376,0)	0,2972
<i>Apa I-Sp1</i>	A-s	> 2 ≤ 2	355,5 (290,4 – 391,9) 316,3 (297,5 – 376,0)	0,5361
<i>Apa I-Alu I</i>	A-A	> 2 ≤ 2	361,2 (300,4 – 391,9) 312,8 (265,6 – 340,5)	0,2337
<i>Fok I-Sp1</i>	f-s	> 2 ≤ 2	368,6 (290,4 – 457,7) 325,0 (284,1 – 376,0)	0,1767
<i>Fok I-Alu I</i>	f-A	> 2 ≤ 2	376,1 (308,0 – 488,1) 314,5 (284,1 – 355,5)	0,0354
<i>Sp1-Alu I</i>	s-A	> 2 ≤ 2	348,0 (290,4 – 382,5) 319,6 (284,1 – 381,5)	0,7195

**Tabla 17.** Valores medianos de las AUC para la osteocalcina tras la combinación de los diferentes alelos de los diferentes polimorfismos acompañados del intervalo de confianza del 95 %.



## **5.9 INTERACCIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE DIFERENTES POLIMORFISMOS EN EL SEGUIMIENTO EVOLUTIVO DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA**

Una vez conocida la evolución del estado óseo en función de los diferentes genotipos de los polimorfismos estudiados, se pudieron identificar tanto los genotipos como los alelos asociados a un menor ascenso relativo, es decir a un peor estado óseo tras el tratamiento quirúrgico (alelos de peor evolución). Posteriormente, se estudió la influencia conjunta de estos alelos. Para ello, se generó una nueva variable: el número de alelos de peor evolución que porta cada paciente. Esta nueva variable se clasificó como: presencia de 2 o menos alelos y presencia de 3 o 4 alelos.

Al igual que se indicó en el apartado 5.8, para las parejas de polimorfismos *C677T-A1298C*, *A1298C-Alu I*, *Bsm I-Taq I*, *Bsm I-Apa I* y *Apa I-Taq I* se encontró una asociación entre ellos, por lo que no se realizó el estudio de influencia conjunta de sus alelos de peor evolución.

### **5.9.1 Densidad mineral ósea en la zona de la columna lumbar**

Los alelos identificados con una más lenta evolución del estado óseo (menores ascensos relativos) fueron el: **T** para el polimorfismo *C677T*, **A** para el polimorfismo *A1298C*, **t** para el polimorfismo *Taq I*, **a** para el polimorfismo *Apa I*, **B** para el polimorfismo *Bsm I*, **S** para el polimorfismo *Sp1* y **a** del polimorfismo *Alu I*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los ascensos relativos entre los portadores de más de dos alelos de peor evolución y los portadores de dos o menos alelos de peor evolución cuando, para un mismo paciente, se combinaron los polimorfismos *C677T* y *Apa I* (Tabla 18).

Polimorfismos agrupados	Alelos de peor recuperación	Nº de alelos de peor recuperación	Ascenso relativo (%)	P U-Mann-Whitney
<i>C677T-Apa I</i>	T-a	> 2	1,37 (-0,01 – 10,96)	0,0211
		≤ 2	5,87 (3,08 – 8,89)	
<i>C677T-Bsm I</i>	T-B	> 2	1,89 (0,09 – 8,67)	0,1251
		≤ 2	5,79 (3,13 – 7,71)	
<i>C677T-Sp1</i>	T-S	> 2	1,96 (0,78 – 7,19)	0,3936
		≤ 2	5,68 (0,48 – 8,05)	
<i>C677T-Alu I</i>	T-A	> 2	1,61 (0,59 – 5,64)	0,1034
		≤ 2	5,44 (2,09 – 9,56)	
<i>A1298C-Apa I</i>	A-a	> 2	1,63 (0,55 – 9,11)	0,5023
		≤ 2	5,27 (0,43 – 10,38)	
<i>A1298C-Bsm I</i>	A-B	> 2	4,19 (2,13 – 8,82)	0,7727
		≤ 2	5,78 (1,50 – 7,01)	
<i>A1298C-Sp1</i>	A-S	> 2	2,84 (0,18 – 9,57)	0,9763
		≤ 2	3,05 (0,80 – 7,04)	
<i>Apa I-Sp1</i>	a-S	> 2	2,43 (0,67 – 10,95)	0,7646
		≤ 2	5,54 (0,07 – 9,56)	
<i>Apa I-Alu I</i>	a-a	> 2	1,57 (0,59 – 10,11)	0,9665
		≤ 2	5,61 (-1,11 – 9,96)	
<i>Bsm I-Sp1</i>	B-S	> 2	2,84 (-0,34 – 14,01)	0,5497
		≤ 2	5,53 (2,79 – 6,98)	
<i>Bsm I-Alu I</i>	B-a	> 2	4,17 (1,11 – 6,16)	0,1913
		≤ 2	5,89 (2,83 – 9,05)	
<i>Sp1-Alu I</i>	S-a	> 2	3,07 (1,17 – 5,80)	0,5922
		≤ 2	4,56 (0,55 – 9,96)	

**Tabla 18.** Valores medianos de los ascensos relativos para la densidad mineral ósea en la zona de la columna lumbar tras la combinación de los diferentes alelos de los diferentes polimorfismos acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

### 5.9.2 Densidad mineral ósea en la zona de la cadera

Los alelos identificados con una más lenta evolución del estado óseo (menores ascensos relativos) fueron el: **T** para el polimorfismo *C677T*, **t** para el polimorfismo *Taq I*, **a** para el polimorfismo *Apa I*, **s** para el polimorfismo *Sp1* y **a** del polimorfismo *Alu I*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los ascensos relativos entre los portadores de más de dos alelos de peor evolución y los portadores de dos

o menos alelos de peor evolución cuando, para un mismo paciente, se combinaron los polimorfismos *C677T* y *Alu I* (Tabla 19).

Polimorfismos agrupados	Alelos de peor recuperación	Nº de alelos de peor recuperación	Ascenso relativo (%)	<i>P</i> U-Mann-Whitney
<i>C677T-Sp1</i>	T-S	> 2	0,98 (-3,36 – 20,64)	0,1841
		≤ 2	5,96 (2,77 – 9,55)	
<i>C677T-Alu I</i>	T-a	> 2	2,69 (0,72 – 6,06)	0,0498
		≤ 2	7,13 (2,63 – 11,50)	
<i>Sp1-Alu I</i>	S-a	> 2	3,13 (0,91 – 6,56)	0,2384
		≤ 2	7,62 (0,60 – 10,14)	

**Tabla 19.** Valores medianos de los ascensos relativos para la densidad mineral ósea en la zona de la cadera tras la combinación de los diferentes alelos de los diferentes polimorfismos acompañados del intervalo de confianza del 95 %.

## **6. DISCUSIÓN**

## 6 DISCUSIÓN

En condiciones normales, la PTH realiza diversas funciones: 1) regula la formación ósea mediante la estimulación de la proliferación de preosteoblastos, promoviendo la diferenciación de preosteoblastos y osteoblastos e inhibiendo la apoptosis osteoblástica; 2) regula la resorción ósea favoreciendo la diferenciación, el aumento y la activación de los osteoclastos, a través de los osteoblastos, mediante el sistema RANK-RANKL-osteoprotegerina; y 3) regula el acoplamiento entre la formación y resorción ósea, permitiendo que el remodelado óseo se realice de forma escalonada y acoplada, de tal forma que la activación y formación de los osteoclastos preceda a la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos <sup>(96)</sup>. En estos procesos son liberadas al torrente sanguíneo diferentes moléculas (marcadores óseos), directamente relacionadas con el remodelado óseo, que pueden ser susceptibles de ser medidas y por consiguiente, ser utilizadas para conocer el estado del proceso de remodelado óseo.

En el HPTP, el exceso de PTH produce una aceleración del remodelado óseo dando lugar a un desacoplamiento de los procesos de resorción y formación como consecuencia de un aumento desproporcionado de la resorción ósea. Este hecho, comporta una pérdida de masa ósea, principalmente cortical y un aumento en las concentraciones de los marcadores óseos. Tras erradicar la fuente causal de la enfermedad (glándulas paratiroides), las concentraciones de PTH disminuyen y se estabilizan produciendo una normalización del proceso de remodelado óseo. Como consecuencia de ello, a medio-largo plazo se produce una recuperación de la masa ósea, principalmente trabecular y una normalización de los marcadores óseos.

El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es una enfermedad relativamente poco común, afecta con más frecuencia a mujeres que a hombres, y aparece preferentemente después de los 60 años. Pese a ello, el HPTP es una enfermedad endocrinológica común siendo la tercera enfermedad endocrina tras la diabetes y la enfermedad tiroidea.

Desde los años 60 hasta la década actual, se han realizado diferentes estudios epidemiológicos relacionados con esta enfermedad con resultados contradictorios, debido principalmente al área geográfica estudiada y al tipo de población seleccionada (sexo, raza y edad).

En Estados Unidos (Rochester, Minnesota), entre los años 1965 y 1974, por cada 100000 habitantes, la incidencia anual ajustada por edad fue de 9 para hombres y 21,4 para mujeres. Entre 1975 y 1982 fue de 41,3 para hombres y 118,6 para mujeres, mientras que en el periodo comprendido entre 1983 y 1992 se produjo un considerable descenso de la misma, alcanzando unos valores de 16,1 para hombres y de 40,8 para mujeres. Por último, entre 1993 y 2001, la incidencia siguió disminuyendo hasta alcanzar los valores de 13,8 y 28,4 para hombres y mujeres, respectivamente <sup>(73, 75)</sup>. El aumento de la incidencia observado entre los años 1975 – 1982 pudo ser atribuido a la aparición de los analizadores automáticos empleados para medir las concentraciones de calcio y paratirina, y por consiguiente a poder diagnosticar pacientes asintomáticos; mientras que el descenso de la misma a partir de los años 1983 – 1992, podría atribuirse al tratamiento hormonal sustitutivo en mujeres postmenopáusicas, a cambios en el hábito dietético (ingesta de alimentos ricos en calcio y vitamina D) o bien al consumo farmacológico de calcio y vitamina D.

En Tromsø (Noruega), en los años 1994 y 1995, la prevalencia del HPTP osciló, en función de la edad, entre el 0,12 % (25 – 29 años) y el 0,95 % (70 – 75 años) en los hombres y entre el 0,06 % (25 – 29 años) y 1,75 % (70 – 75 años) en las mujeres (117).

En otra población europea (Verona, Italia), entre los años 2001 y 2002, la prevalencia del HPTP corregida por edad y sexo fue del 0,3 %, mientras que en mujeres con edades comprendidas entre los 55 y 75, ésta fue del 2,1 % (74).

A raíz de estos estudios, podemos afirmar que la incidencia del HPTP es mayor en mujeres que en hombres y mayor en personas con edades avanzadas. En nuestro estudio, el grupo de HPTP estaba formado por 75 pacientes de los cuales 58 (77 %) eran mujeres y cuyo intervalo de edad más frecuente de presentación, fue de 57 y 87 años (82 %). El 33 % de los pacientes fueron hombres y la incidencia de la enfermedad fue mayor en edades comprendidas entre los 53 y 86 años. Nuestros resultados reflejan y confirman la mayor incidencia de la enfermedad en el sexo femenino por un lado, y por otro, que la enfermedad presenta un mayor número de casos en personas con edades superiores a los 50 años.

En época pasada, el HPTP era diagnosticado únicamente mediante la aparición de alguna o varias manifestaciones clínicas como la formación de cálculos renales, nefrocalcinosis, debilidad muscular, osteopenia u osteoporosis, diferentes grados de disfunción renal, osteitis fífrica quística, hipertensión arterial, síntomas depresivos, debilidad muscular severa, delirio y coma. Tras la introducción de los analizadores automáticos en 1970, la hipercalcemia se detectó con más frecuencia y la prevalencia e incidencia del HPTP aumentaron más de lo que previamente se había estimado, ya que permitían diagnosticar a pacientes con menos síntomas o incluso asintomáticos. Este hecho condujo a que, en 1990, el *National Institutes of Health*

(NIH) promoviera una conferencia sobre el diagnóstico y manejo del hiperparatiroidismo primario asintomático, cuya guía de práctica clínica fue utilizada hasta el año 2002. Debido a los recientes avances en el diagnóstico de HPTP, en las técnicas de imagen, en la aproximación quirúrgica del proceso y en los progresos en el tratamiento médico, el NIH, la *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) y la *Endocrine Society* publicaron un nuevo documento donde se reevaluaron los criterios diagnósticos del HPTP, los criterios de cirugía, el tratamiento médico específico, la monitorización de los pacientes no intervenidos, las posibilidades de la cirugía mínimamente invasiva, el papel y las limitaciones de las técnicas de imagen, y los retos de investigación para la próxima década.

En la actualidad, el diagnóstico definitivo del HPTP se establece mediante la observación de una hipercalcemia asociada a concentraciones plasmáticas de PTH por encima del intervalo de referencia, incluso en estadios asintomáticos. Además, es conocido que el HPTP, aparte de cursar con concentraciones elevadas mantenidas de calcio y paratirina (PTH), presenta concentraciones disminuidas o normales de fosfato y 25-hidroxi vitamina D <sup>(1, 76-79)</sup> y concentraciones elevadas de diferentes marcadores óseos como la fosfatasa alcalina, el C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I (CTx) y la osteocalcina <sup>(1, 76-79)</sup>.

En el estudio de nuestros pacientes, las concentraciones medias de calcio, PTH, fosfatasa alcalina y osteocalcina también se encontraron aumentadas. Las concentraciones medias de fosfato fueron cercanas al límite inferior del intervalo de referencia, las concentraciones de CTx cercanas al límite superior del intervalo de referencia y las concentraciones medias de 25-hidroxi vitamina D normales.

Por otro lado, la afectación ósea en el HPTP ha sido reconocida desde que por primera vez fue descrita la enfermedad, siendo una de sus principales



manifestaciones clínicas. Clínico-radiológicamente se aprecian tres formas de afectación ósea en el HPTP: la osteítis fibrosa, la osteoporosis y la osteosclerosis. Aunque muchos enfermos con HPTP tienen alteraciones histológicas en hueso, en pocos de ellos se manifiestan clínicamente de forma aparente por lo que las alteraciones esqueléticas del HPTP suelen ser subclínicas y sólo detectables en la biopsia ósea. Las anomalías suelen detectarse también radiológicamente por fracturas, osteopenia u osteoporosis, osteosclerosis, pérdida de la lámina dura dentaria y lesiones quísticas en el esqueleto. Por consiguiente, la mayoría de enfermos con HPTP suelen presentar osteopenia u osteoporosis difusa o vertebral <sup>(1, 80-86)</sup>.

La disminución de la densidad mineral ósea (DMO) es una complicación conocida en el HPTP y suele ser asintomática durante un gran período de tiempo hasta que aparece la fractura, por lo que la medida de la masa ósea está indicada en la evaluación inicial del enfermo con HPTP, aún asintomático, ya que en los pacientes con HPTP se pierde hueso a diferente velocidad en diversas zonas del esqueleto, por lo que la medida de la masa ósea en un hueso no predice su pérdida a otro nivel <sup>(80-86)</sup>.

Desde la introducción de las técnicas densitométricas, diversos estudios han demostrado la existencia de una pérdida de DMO en pacientes con HPTP cuando se comparan con un grupo similar en edad y sexo, y que esta pérdida ósea no es homogénea en todo el esqueleto <sup>(84, 92-101, 118-127)</sup>.

En nuestro estudio la presencia de osteoporosis (T-Score < -2,5) se presentó en el 18,6 % (DMO de cadera) y en el 27,9 % (DMO columna lumbar) de los pacientes. Un 65,1 % (DMO cadera) y un 58,1 % (DMO columna lumbar) presentaron osteopenia

(T-Score entre -1 y -2,5) y sólo un 16,3 % (DMO cadera) y un 14,0 % (DMO columna lumbar) presentaron una masa ósea normal (T-Score  $\pm$  1).

La detección de este grupo de pacientes osteopénicos y osteoporóticos se corresponde con los estudios que indican la existencia de manifestaciones óseas en pacientes con hiperparatiroidismo primario.

Existen numerosos estudios que dedican su atención a medir la masa ósea en enfermos con HPTP, con el objeto de esclarecer cuál es el tipo de hueso o región esquelética que se afecta más en esta enfermedad, cuál es la velocidad y significado de esta pérdida ósea y si de alguna manera ello es relevante para tomar una decisión sobre el tratamiento quirúrgico <sup>(84, 92-101, 118-127)</sup>.

En relación con el tipo de hueso afectado, la mayoría de los autores han evidenciado una mayor pérdida de hueso cortical, que es predominante en el esqueleto periférico <sup>(91, 95, 96, 98, 118, 121, 122)</sup>. Son menos los estudios de la DMO del esqueleto axial, formado principalmente por hueso trabecular, realizado en pacientes con HPTP <sup>(92-98, 118-122)</sup>. Algunos autores sostienen que el exceso de PTH afecta en mayor grado a las regiones con hueso trabecular <sup>(97, 120)</sup>. Los hallazgos no son uniformes, ya que también se ha descrito escasa afectación a este nivel <sup>(91, 121, 122)</sup>. Otros autores observaron que la afectación ósea trabecular fue más intensa que la cortical <sup>(118-120)</sup>. Por el contrario, otros estudios encuentran igual pérdida en ambos tipos de hueso <sup>(123)</sup>. Estas diferencias se han atribuido a las técnicas utilizadas, absorciometría de un fotón (SPA) y absorciometría de doble fotón (DPA) para medir la DMO, por lo que se ha recomendado la absorciometría dual de rayos X (DXA) por su mayor precisión y reproducibilidad.

Estudios histomorfométricos de tejido óseo en HPTP muestran un aumento del remodelado óseo, con pérdida de hueso cortical <sup>(124, 125)</sup>, y conservación del volumen del hueso trabecular <sup>(92, 124-125)</sup>.

Recientes estudios han encontrado que el volumen del hueso trabecular está aumentado en el HPTP en comparación con sujetos normales <sup>(92, 96)</sup>, sugiriendo que los niveles elevados de PTH endógena ejercen una acción dual sobre el hueso: tiene lugar una mayor pérdida del hueso cortical (efecto catabólico) y una conservación del hueso trabecular (efecto anabólico). Estos autores han propuesto que un aumento en la actividad y la vida media del osteoblasto mantiene intacta la estructura del hueso, por lo que en el HPTP leve se aprecia un efecto protector sobre el hueso trabecular.

El tipo de hueso predominante en la columna lumbar es el trabecular, mientras que en la cadera existe tanto hueso cortical como trabecular. En nuestro grupo de pacientes, tras la correspondiente medición de la DMO, se observó una proporción similar de pacientes osteopénicos y osteoporóticos en ambas localizaciones densitométricas. Este hecho podría indicar que ha existido una pérdida de hueso trabecular y cortical, sin poder afirmar si el grado de afectación ha sido mayor en uno u otro tipo óseo.

Actualmente, tal y como se ha comentado, es conocida la presencia de receptores de paratirina y receptores de la proteína relacionada con la paratirina (PTHrp) en los osteoblastos <sup>(87, 88)</sup> que justifican los procesos de formación, mientras que los procesos de resorción son justificados mediante los efectos de la PTH sobre los osteoclastos mediada por los osteoblastos a partir del sistema RANK-RANKL-osteoprotegerina <sup>(88, 89)</sup>. Diversos estudios, basados en análisis histomorfométricos y biopsias óseas, demostraron que pacientes con HPTP muestran un aumento de la

masa ósea y sólo cuando la PTH actúa durante mucho tiempo sobre la unidad de remodelado óseo, se produce un desacoplamiento de esta unidad y una desmineralización ósea <sup>(84, 90, 91)</sup>.

En el HPTP leve, el ciclo de remodelación, la frecuencia de activación y la tasa de formación ósea están aumentadas, tanto en el hueso cortical como en el trabecular. La profundidad de la resorción ósea mediada por osteoclastos, sin embargo, está aumentada solamente en las superficies endocorticales del hueso. El resultado neto del doble efecto de la PTH en los diferentes compartimentos esqueléticos es de esperar que dé como resultado una pérdida de hueso cortical, con mantenimiento o incluso un aumento en el hueso trabecular <sup>(84, 92-95)</sup>.

En nuestro grupo de pacientes, se observó una correlación negativa entre las DMO (tanto de cadera como de columna lumbar) antes de la paratiroidectomía y las concentraciones preoperatorias de paratirina, siendo estadísticamente significativa en el caso de la DMO de cadera. Concentraciones elevadas y mantenidas de PTH (habituales en el HPTP) explicarían la pérdida de masa ósea a nivel del hueso trabecular (la zona lumbar está mayoritariamente formada por hueso trabecular). Por otro lado, concentraciones elevadas y mantenidas de PTH explicarían la pérdida de masa del hueso trabecular y cortical (la zona de la cadera está formada por ambos tipos de hueso). Conociendo el grado de pérdida de hueso trabecular gracias a la DMO en la zona de la columna lumbar, el grado de pérdida ósea cortical y trabecular gracias a la DMO en la zona de la cadera y que en la zona de la cadera se observó una mayor pérdida de masa ósea, podemos afirmar que en nuestro grupo de pacientes, el exceso de PTH dió como resultado una mayor pérdida de hueso cortical.

Si el diagnóstico del HPTP ha sido establecido, el tratamiento de elección es la exploración quirúrgica y extirpación de las glándulas paratiroides afectadas. Tras la realización de la paratiroidectomía, y pese a la existencia de indicadores del éxito de la paratiroidectomía como la medición perioperatoria de las concentraciones de PTH, debe realizarse un seguimiento de los pacientes afectados de HPTP que han sido sometidos a este tipo de cirugía, para poder valorar las características del remodelado óseo en relación con la actividad de la enfermedad y monitorizar la evolución de la enfermedad tras el tratamiento <sup>(52, 102, 103)</sup>. Para ello, es útil estudiar diversas magnitudes biológicas relacionadas con el hueso en diferentes momentos postquirúrgicos <sup>(31, 77, 79, 96, 98)</sup> así como la evolución de la masa ósea <sup>(76, 96-98)</sup>.

Tal y como indican diversos estudios, después de la realización de una paratiroidectomía, la concentración de paratirina disminuye (es el objetivo quirúrgico inmediato). Consecuencia directa de la extirpación de las glándulas paratiroides, y por consiguiente de la normalización de las concentraciones de paratirina, la concentración de calcio disminuye, mientras que las concentraciones de fosfato y 25-hidroxi vitamina D, aumentan <sup>(31, 79, 95, 96, 99-101)</sup>.

En el estudio de nuestros pacientes, la cirugía indujo una marcada disminución de las concentraciones de calcio y paratirina, aumentos considerables en las concentraciones de fosfato y aumentos moderados en las concentraciones de 25-Hidroxi-vitamina D.

El porcentaje de descenso o aumento varía en función de la magnitud estudiada y del periodo estudiado. En términos generales, el mayor descenso o aumento se da entre los meses previos a la intervención y los días posteriores a la realización de la cirugía <sup>(96)</sup>. Por otro lado, las magnitudes analizadas se estabilizan en los meses posteriores <sup>(96)</sup>.

En el estudio de nuestros pacientes, se produjo una situación similar a la descrita en la bibliografía. En todos los casos, los mayores aumentos o descensos fueron estadísticamente significativos y tuvieron lugar en estos periodos. Este hecho no es de extrañar si se tiene en cuenta que se erradica la fuente de la enfermedad estudiada: exéresis parcial o total de las glándulas paratiroides, provocando una disminución de las concentraciones de paratirina, principal hormona reguladora del metabolismo fosfocálcico. Además, todas estas magnitudes biológicas se estabilizaron a partir del tercer mes posterior a la intervención como consecuencia de la recuperación de las glándulas paratiroides.

Por otro lado, después de una cirugía paratiroidea se normaliza el proceso de remodelado óseo por lo que las concentraciones de los marcadores óseos disminuyen estabilizándose a partir del sexto mes posterior a la cirugía<sup>(31, 79, 95, 96, 99-101)</sup>. El porcentaje de descenso varía en función del tipo de marcador óseo y del periodo estudiado<sup>(96)</sup>.

En nuestros pacientes, las concentraciones de fosfatasa alcalina no dejaron de disminuir hasta el sexto mes posterior a la intervención, momento a partir del cual, éstas se estabilizaron. Hasta llegar a este periodo, se observaron descensos consecutivos constantes. Este descenso paulatino podría explicarse atendiendo al estrés quirúrgico y a la normalización a medio plazo del sistema de remodelado óseo<sup>(96)</sup>.

Por el contrario, en el caso del CTx, el mayor descenso se produjo entre los meses previos a la intervención y los días posteriores a la realización de la cirugía. A partir de este instante, las concentraciones de CTx permanecieron constantes. Este hecho se explicaría por la inmediata detención de los procesos resortivos del tejido óseo,

principalmente del maduro, como consecuencia de la acción inmediata pero indirecta de la PTH sobre el osteoclasto <sup>(96)</sup>.

La evolución de las concentraciones de osteocalcina fue similar a la encontrada para la fosfatasa alcalina, observándose un mínimo descenso entre los meses previos y los días posteriores a la paratiroidectomía. Este comportamiento, observado por otros autores <sup>(96, 102, 104)</sup>, podría explicarse atendiendo a que tiene lugar una estabilización del proceso de remodelado óseo: en los días posteriores a la intervención quirúrgica se liberaría OC desde la matriz ósea hacia la sangre en el proceso de resorción ósea <sup>(102, 104)</sup> y en los meses posteriores, la OC procedería principalmente de la síntesis osteoblástica en el proceso de formación ósea.

En general, se acepta que la cirugía del HPTP produce una mejoría de la masa ósea; sin embargo, aunque algunos estudios han descrito un incremento en la DMO después de la intervención quirúrgica, otros no encuentran cambios, e incluso algunos describen una reducción en la DMO tras la cirugía <sup>(96)</sup>. Estas discrepancias podrían ser debidas al periodo postoperatorio estudiado (6 meses, al año, a los 2, 3, 10 y 15 años), a la edad, sexo y raza de la población escogida, a la zona ósea estudiada (columna lumbar, cadera, cuello de fémur, radio) o bien, como se comentó anteriormente, al principio de medida empleado para determinar la DMO. Por otra parte, diferentes estudios describen que, en pacientes con HPTP no sometidos a cirugía paratiroidea, más del 25 % mostraron una progresiva pérdida de masa ósea a lo largo de los años: en los primeros años la pérdida de masa es prácticamente imperceptible, mientras que a los 10 y 15 años la reducción de masa ósea es considerable <sup>(127, 128)</sup>. Este hecho pone de manifiesto el efecto positivo de la paratiroidectomía sobre la ganancia de masa ósea.

A diferencia de lo que ocurría en relación al tipo de hueso afectado en el HPTP (cortical o trabecular), la mayoría de estudios consultados indican que después del tratamiento quirúrgico del hiperparatiroidismo primario, la masa ósea aumenta en el hueso trabecular y disminuye o permanece inalterada en el hueso cortical <sup>(96, 99, 105-108, 127, 128)</sup>. En estos estudios, los porcentajes de ascenso de la DMO al año de la realización de la intervención quirúrgica oscilaron entre el 0,4 % y 4,16 % para columna lumbar y entre el 0,2 % y 2,61 % para cadera.

En nuestro estudio, después de transcurrir un año desde la realización de la paratiroidectomía, la densidad mineral ósea en la columna lumbar y cadera aumentó significativamente respecto a la situación basal en un 4,9 % y 5,0 %, respectivamente. Puesto que en la zona de la columna lumbar existe una mayor presencia de hueso trabecular y en la zona de la cadera existen lugares con hueso cortical y trabecular, y dado que el porcentaje de aumento de las DMO en ambas localizaciones es similar, podemos deducir que en nuestro grupo de pacientes el efecto de la cirugía paratiroidea dió lugar a un mayor aumento de masa trabecular y no varió la masa ósea cortical.

Como se ha comentado anteriormente, tras la realización de la paratiroidectomía, las concentraciones de PTH se estabilizan dentro del intervalo de referencia, y por consiguiente es de esperar que, a plazo medio, los procesos de resorción y formación controlados por la PTH se normalicen, al igual que el equilibrio existente entre ambos. Este hecho provocaría, por un lado, que la masa ósea aumentase o bien que se mantuviera (dependería del tipo de hueso), y por otro, que las concentraciones de los marcadores óseos se normalizasen. Diferentes estudios han observado una correlación entre las concentraciones de marcadores óseos y la masa ósea medida mediante técnicas histomorfométricas y densitométricas <sup>(96, 103)</sup>.



Conociendo esta relación, y para poder valorar la evolución del estado óseo tras la cirugía paratiroidea, sería interesante poder relacionar las concentraciones de PTH y de diferentes marcadores óseos, en diferentes momentos pre y post quirúrgicos, con los cambios en la masa ósea producidos tras la paratiroidectomía.

Se han realizado diversos estudios sobre la capacidad de diversas magnitudes biológicas para identificar a los pacientes con HPTP que presentarían una mejor respuesta a la paratiroidectomía (valorada según la ganancia de masa ósea) <sup>(79, 96, 101)</sup>. Estos estudios están basados en análisis de correlación entre las concentraciones preoperatorias tanto de PTH como de diferentes marcadores óseos y porcentaje de cambio de la DMO en la columna lumbar. En ellos se ha observado una correlación positiva entre las concentraciones preoperatorias de PTH, fosfatasa alcalina y osteocalcina y el incremento de DMO en columna lumbar <sup>(79, 96, 101)</sup>. En nuestro caso, también encontramos esta correlación para las concentraciones preoperatorias de PTH y fosfatasa alcalina en las zonas de la columna lumbar y cadera.

Estos resultados nos indican que, a mayores concentraciones preoperatorias de PTH y fosfatasa alcalina (ALP) existirá una mayor recuperación de la masa ósea tras la realización de la cirugía paratiroidea y viceversa. Por consiguiente, las concentraciones preoperatorias de PTH y ALP podrían ser de utilidad para valorar cambios en la DMO a los (12 – 18) meses posteriores a la intervención, es decir, la respuesta a largo plazo al tratamiento del HPTP.

Para valorar cómo influía en el estado óseo el cambio en las concentraciones de PTH y de marcadores óseos, en diferentes momentos posteriores a la cirugía, se correlacionaron los incrementos (ascensos relativos) de la DMO en columna lumbar

y cadera con las disminuciones de las concentraciones de PTH y los diferentes marcadores óseos.

Se observó una correlación positiva entre los incrementos de DMO en columna lumbar y cadera con las disminuciones de las concentraciones de PTH y CTx a los 3, 6 y (12 – 18) meses posteriores a la intervención, y con las disminuciones de las concentraciones de osteocalcina a los 6 y (12 – 18) meses posteriores a la paratiroidectomía. En el caso de la fosfatasa alcalina, se observó una correlación positiva entre los incrementos de DMO en columna lumbar y las disminuciones de sus concentraciones al día siguiente de la intervención, a los 3 y a los 6 meses posteriores a la cirugía, mientras que para los incrementos de DMO en la cadera, esta correlación se observó con las disminuciones a los 3, 6 y (12 – 18) meses posteriores a la paratiroidectomía. Las correlaciones entre la disminución de las concentraciones de PTH y CTx (en el día después de la intervención quirúrgica) y los incrementos de DMO de columna lumbar y cadera, respectivamente, rozaron la significación estadística.

Estos resultados nos indican que cuanto mayores sean las disminuciones de las concentraciones de PTH, fosfatasa alcalina (ALP), CTx y osteocalcina (OC) tras la paratiroidectomía, mayor será la recuperación de la masa ósea. Por ello, las concentraciones de PTH, ALP, CTx y OC, en diferentes momentos postquirúrgicos respecto a la situación basal de las mismas, podrían ser empleadas para valorar cambios en la DMO tras la cirugía paratiroidea. Concretamente, las concentraciones de ALP podrían utilizarse en todos los momentos postquirúrgicos, las concentraciones de PTH y CTx a los 3, 6 y (12 – 18) meses y las concentraciones de OC deberían emplearse a partir del sexto mes posterior a la cirugía. La utilización de estos marcadores en los diferentes momentos descritos se corresponde, en todo

momento, con la evolución del estado óseo (si los procesos que predominan son de resorción o de formación) y con el tipo de hueso que se recupera tras la cirugía (trabecular).

Todos estos resultados apoyan la utilidad de la medición, en la práctica clínica, de estas magnitudes biológicas ya que sus concentraciones, en diferentes momentos, podrían ayudar a valorar la respuesta de la masa ósea durante todo el proceso evolutivo de los pacientes sometidos a paratiroidectomía.

La identificación de nuevos genes o bien el conocimiento de nuevas funciones de genes ya conocidos, puede ser de utilidad para entender la afectación ósea debida al HPTP y la evolución de la misma tras la paratiroidectomía. Por otro lado, diferentes factores ambientales pueden modificar notablemente el efecto de los factores genéticos sobre el hueso. Entre ellos cabe pensar, por ejemplo, en la dieta, el ejercicio y la exposición al sol.

La enfermedad ósea es multifactorial y multigénica. Así, los factores de riesgo de tipo genético esto es, ciertos alelos o variantes génicas, serán transmitidos de generación en generación, pero su expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes y con factores ambientales.

Por ello, puede resultar de utilidad llevar a cabo estudios de asociación de diversos polimorfismos genéticos relacionados con el hueso con la DMO y con diferentes marcadores óseos ya que permitirían poder profundizar en los mecanismos del HPTP, ayudar a valorar la respuesta al tratamiento y a la identificación de pacientes que fueran más proclives a desarrollar una afectación ósea debida al HPTP.

Son escasos los estudios que hacen referencia a las distribuciones o frecuencias genotípicas de diferentes polimorfismos genéticos relacionados con el hueso en pacientes afectados de HPTP, siendo los distintos polimorfismos del gen del VDR los

más estudiados. Para los polimorfismos *Bsm I*, *Apa I*, *Taq I* y *Fok I*, las frecuencias genotípicas, ordenadas de mayor a menor, corresponden a los genotipos **bb** > **Bb** > **BB**, **Aa** > **AA** > **aa**, **TT** > **Tt** > **tt** y **Ff** > **FF** > **ff**, respectivamente <sup>(109-111)</sup>. Por otro lado, las frecuencias de los alelos mayoritarios son: **b** (69 %), **a** (59 %), **T** (69 %) y **F** (91 %) <sup>(109-111)</sup>. En nuestro caso, las frecuencias genotípicas y alélicas observadas no coincidieron con las obtenidas en la bibliografía debido, posiblemente, a las características de la población estudiada (sexo, edad y raza).

En la bibliografía no están descritos estudios evolutivos, en pacientes con HPTP sometidos a cirugía paratiroidea, que asocien las concentraciones de marcadores óseos con diversos genotipos de polimorfismos genéticos relacionados con el hueso. Únicamente está descrito un número reducido de estudios descriptivos en pacientes sanos que asocian las concentraciones de diferentes marcadores óseos en diferentes momentos con algunos polimorfismos genéticos de determinados genes relacionados con el hueso.

Pese a ser estudios claramente diferenciados, todos presentan una característica en común: observar la relación existente entre diversos polimorfismos genéticos relacionados con el hueso y el estado óseo en momentos determinados.

En individuos europeos sanos de raza blanca, las mayores concentraciones de osteocalcina se observan para los genotipos **BB** <sup>(112)</sup>, **AA** <sup>(112)</sup>, **tt** <sup>(113)</sup> y **ff** <sup>(113)</sup> de los polimorfismos *Bsm I*, *Apa I*, *Taq I* y *Fok I* del gen del VDR, respectivamente. En mujeres europeas premenopáusicas de raza blanca, las concentraciones de CTx son mayores para los genotipos **SS** del gen del COL1A1 <sup>(114)</sup>, mientras que para los polimorfismos *Fok I* y *Bsm I* no parece haber asociación con las concentraciones de diferentes marcadores óseos <sup>(115, 116)</sup>. Los pacientes que presenten estos genotipos

tendrán una masa ósea menor y por consiguiente, mayor riesgo de padecer osteopenia u osteoporosis a lo largo de la vida <sup>(112- 116)</sup>.

En nuestro caso, las mayores áreas bajo la curva de los marcadores óseos (más lenta normalización de sus concentraciones) se observaron para el genotipo **TT** del polimorfismo *C677T* (MTHFR) en el caso de la fosfatasa alcalina, el genotipo **AA** del polimorfismo *A1298C* (MTHFR) para el CTx y el genotipo **tt** del polimorfismo *Taq I* (VDR) para la osteocalcina. Estos resultados nos indicarían que los pacientes que presentasen estos polimorfismos podrían tener una peor evolución del estado óseo tras la cirugía paratiroidea.

Por otra parte, parece existir una participación activa del gen de la MTHFR en la evolución del estado óseo tras la paratiroidectomía. Esta participación no es de extrañar, si tenemos en cuenta que este gen contiene la información codificada necesaria para la síntesis de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR), que ésta es una enzima que cataliza el paso de 5-metiltetrahidrofolato, en presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , a 5,10-metilentetrahidrofolato, molécula que tiene como principal función ser dadora de grupos monocarbonados (principalmente grupos metilo) y que en los procesos de remodelado óseo se sintetizan moléculas donde son necesarios múltiples procesos de metilación y remetilación. La presencia de los alelos **T** (variante minoritaria) del polimorfismo *C677T* y **A** (variante mayoritaria) del polimorfismo *A1298C*, tanto en homocigosis como en heterocigosis, produciría una pérdida de funcionalidad de la enzima debido a un aumento de la termolabilidad de la misma, viéndose afectados los procesos de metilización o remetilización y por consiguiente, los mecanismos de recuperación del hueso.

Para el resto de los genotipos de cada polimorfismo, pese a no observarse una asociación significativa con las áreas bajo la curva de los marcadores óseos, podría

ser de utilidad conocer cuáles de ellos presentan mayores áreas bajo la curva y poder conocer así, el posible efecto desfavorable que se ejercería en el hueso tras la paratiroidectomía. Así, basándonos en nuestros resultados, los pacientes que presenten los genotipos **TT** del polimorfismo *C677T* (MTHFR), **AA** del polimorfismo *A1298C* (MTHFR), **tt** del polimorfismo *Taq I* (VDR), **AA** del polimorfismo *Apa I* (VDR), los portadores del alelo **s** del polimorfismo *Sp1* (COL1A1) y los portadores del alelo **A** del polimorfismo *Alu I* (CR) podrían tener una peor evolución del estado óseo tras la cirugía paratiroidea.

Basándonos también en nuestros datos, se puede sugerir que existen determinadas variantes alélicas que podrían estar asociadas a una peor evolución del estado óseo tras la paratiroidectomía. Así, se podría deducir que la presencia de los alelos **T** del polimorfismo *C677T*, **A** del polimorfismo *A1298C*, **t** del polimorfismo *Taq I*, **A** del polimorfismo *Apa I*, **s** para el polimorfismo *Sp1* y **A** para el polimorfismo *Alu I* tendrían un efecto desfavorable en la evolución ósea tras la paratiroidectomía.

Para los polimorfismos *Bsm I* y *Fok I* del gen del VDR, los genotipos y alelos de peor evolución dependieron del marcador óseo estudiado y por consiguiente no fueron considerados.

Habiendo detectado grosso modo los alelos sospechosos de desfavorecer la mejoría del hueso tras la paratiroidectomía, y teniendo en cuenta que la enfermedad ósea es multigénica, nuestro siguiente paso fue estudiar si la interacción entre estos alelos de diferentes polimorfismos podía influir conjuntamente sobre el estado óseo (observado en función de las AUC de los marcadores óseos), de manera que se incrementase el efecto al aumentar el número de alelos de peor evolución que presentaban los pacientes. Así, según nuestros resultados, los portadores de 3 ó 4 alelos de peor evolución cuando se combinan los polimorfismos *C677T* y *Apa I*,

*C677T* y *Taq I* (para la fosfatasa alcalina), *A1298C* y *Alu I* (para el CTX), *C677T* y *Apa I*, *A1298C* y *Apa I* y *C677T* y *Alu I* (osteocalcina) indicarían una peor evolución del estado óseo tras la paratiroidectomía.

Polimorfismo agrupados	Genotipos combinados de peor evolución	Marcador óseo donde se ha observado
<i>C677T-Apa I</i>	TTAA TTAa CTAA	Fosfatasa alcalina Osteocalcina
<i>C677T-Taq I</i>	TTtt TTTt CTtt	Fosfatasa alcalina
<i>C677T-Alu I</i>	TTAA TTAa CTAA	Osteocalcina
<i>A1298C-Apa I</i>	AAAA AAAa ACAA	Osteocalcina
<i>A1298C-Alu I</i>	AAAA AAAa ACAA	CTx

**Tabla 20.** Genotipos combinados de peor evolución de diferentes polimorfismos que pueden influir sobre el estado óseo (en función de las AUC de los distintos marcadores óseos) tras la cirugía paratiroidea.

Al igual que ocurría con los marcadores óseos, en la bibliografía no están descritos estudios evolutivos de la densidad mineral ósea según los genotipos de polimorfismos de determinados genes relacionados con el hueso en pacientes con HPTP sometidos a cirugía paratiroidea. Existe un elevado número de estudios descriptivos o de asociación entre la densidad mineral ósea, medida en momentos puntuales, y algunos polimorfismos de determinados genes relacionados con el hueso, en pacientes sanos y en pacientes que padecen osteoporosis. Cabe destacar que en la mayoría de ellos, no se han observado diferencias significativas entre la DMO en la zona lumbar y cadera en función de los genotipos de los

polimorfismos *Bsm I*, *Apa I*, *Taq I* y *Fok I* del gen del VDR y *Sp1* del COL1A1<sup>(111, 114-116)</sup>.

En nuestro caso, no se realizaron estudios descriptivos o de asociación como los comentados anteriormente, sino un estudio asociativo basado en el seguimiento evolutivo de la densidad mineral ósea (aumento relativo) en la zona lumbar y en la cadera, en función de los genotipos de polimorfismos de determinados genes relacionados con el hueso en pacientes con HPTP sometidos a cirugía paratiroidea, sin obtenerse asociación alguna.

Pese a no haberse observado una asociación significativa entre los ascensos en la DMO y los diferentes genotipos de un mismo polimorfismo, podía ser de utilidad conocer cuáles de ellos presentan menores ascensos y tener así una orientación sobre el posible efecto desfavorable que se ejercería en el estado óseo tras la paratiroidectomía. Así, basándonos en nuestros resultados, los pacientes portadores del alelo **T** del polimorfismo *C677T* (MTHFR) y los genotipos **tt** del polimorfismo *Taq I* (VDR), **aa** del polimorfismo *Apa I* (VDR), **bb** del polimorfismo *Bsm I* (VDR) y los portadores del alelo **a** del polimorfismo *Alu I* (CR) podrían tener una peor evolución del estado óseo tras la cirugía paratiroidea.

Si realizamos las mismas consideraciones anteriormente citadas, en función de los alelos de cada polimorfismo (alelos de peor evolución), podríamos afirmar que la presencia de los alelos **T** del polimorfismo *C677T*, **t** del polimorfismo *Taq I*, **a** del polimorfismo *Apa I*, **b** del polimorfismo *Bsm I* y **a** para el polimorfismo *Alu I* tendría un efecto desfavorable en el estado óseo tras la paratiroidectomía.

Para los polimorfismos *A1298C* del gen de la MTHFR, *Sp1* del gen del COL1A1 y *Fok I* del gen del VDR, los genotipos y alelos de peor evolución dependieron de si la



DMO se midió en la zona de la cadera o en la columna lumbar y por consiguiente, no fueron considerados.

De la misma manera que se comentó anteriormente, la interacción entre alelos de diferentes polimorfismos podría influir conjuntamente sobre el estado óseo (observado en función de los menores descensos en la DMO), incrementándose el efecto al aumentar el número de alelos de peor evolución. Así, según nuestros resultados, los portadores de 3 ó 4 alelos de peor evolución cuando se combinan los polimorfismos *C677T* y *Apa I* (columna lumbar) y *C677T* y *Alu I* (cadera) indicarían una peor evolución del estado óseo tras la paratiroidectomía.

Polimorfismo agrupados	Genotipos combinados de peor evolución	Zona ósea donde se ha observado
<i>C677T-Apa I</i>	TTaa TTAa CTaa	Lumbar
<i>C677T-Alu I</i>	TTaa TTAa CTaa	Cadera

**Tabla 21.** Genotipos combinados de peor evolución de diferentes polimorfismos que pueden influir sobre el estado óseo (en función de DMO) tras la cirugía paratiroidea.

Tal y como se ha comentado, la enfermedad ósea es multifactorial. Entre los diferentes factores que podrían influir se encuentran los genéticos que podrían representar, probablemente, un porcentaje minoritario. De los muchos genes que podrían estar implicados (aquí sólo se han estudiado unos pocos de los que podrían estar relacionados con la enfermedad ósea), lo más probable es que tuvieran efectos individuales pequeños sobre el estado óseo. Por eso, es importante haber

encontrado algún efecto individual significativo (al menos en el caso de algunos marcadores óseos) que podrían ayudarnos a valorar, junto a los factores ambientales, la evolución del estado óseo tras el tratamiento de enfermedades como el HPTP.

## **7. CONCLUSIONES**

### 7 CONCLUSIONES

1. En pacientes con hiperparatiroidismo primario, concentraciones preoperatorias elevadas de paratirina están asociadas con una mayor pérdida de masa ósea cortical.
2. En pacientes con hiperparatiroidismo primario, la paratiroidectomía da lugar a una estabilización de las concentraciones séricas de calcio, paratirina, fosfatasa alcalina, C-Telopéptido isomerizado del colágeno de tipo I, osteocalcina, fosfato y 25-Hidroxi Vitamina D, alcanzando valores fisiológicos a lo largo de un periodo de (12 – 18) meses.
3. En pacientes con hiperparatiroidismo primario, la paratiroidectomía da lugar a un aumento de la densidad mineral ósea en las zonas de la columna lumbar y cadera aunque sin llegar a alcanzar valores normales. Este aumento parece indicativo de una ganancia de masa ósea sólo trabecular, en un seguimiento de (12 – 18) meses.
4. Las concentraciones preoperatorias de paratirina y fosfatasa alcalina permiten valorar los cambios en la densidad mineral ósea a los (12 – 18) meses tras la intervención y por consiguiente, la respuesta al tratamiento del hiperparatiroidismo primario.

5. Las disminuciones relativas en las concentraciones de ALP en todos los momentos postquirúrgicos estudiados, las de PTH y CTx a los 3, 6 y (12 – 18) meses y las de OC a partir del sexto mes posterior a la cirugía, todas ellas respecto a la concentración basal, podrían ser empleadas para valorar los cambios en la DMO tras la cirugía paratiroidea.
  
6. La presencia de determinados genotipos o alelos de diferentes polimorfismos, permiten ayudar a valorar la evolución del estado óseo tras la cirugía paratiroidea (en función de los cambios en concentraciones de ALP, CTx y OC, y de la DMO). Así, en pacientes con HPTP sometidos a paratiroidectomía, podrían indicar una peor recuperación del estado óseo:
  - La presencia del genotipo **TT** o al menos del alelo **T** del polimorfismo *C677T* del gen MTHFR.
  
  - La presencia del genotipo **AA** del polimorfismo *A1298C* del gen MTHFR.
  
  - La presencia del genotipo **tt** del polimorfismo *Taq I* del gen VDR.
  
  - La presencia del genotipo **bb** del polimorfismo *Bsm I* del gen VDR.
  
7. La presencia conjunta de determinadas variantes alélicas de diferentes genes influye negativamente sobre el estado óseo y, por consiguiente, podría ser indicativa de una peor evolución del estado óseo tras la paratiroidectomía; en concreto, las combinaciones de los alelos **T** (del polimorfismo *C677T* del gen MTHFR), **a** (del *Apa I*, del gen VDR) y **a** (del *Alu I*, del gen CTR).

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## 8 BIBLIOGRAFIA

1. Farreras Valentí P, Rozman Borstnar C. Medicina interna. 15ª ed. Madrid: Harcourt; 2004.
2. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2001.
3. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they catalyse. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> [Consulta 2007 – 07 – 23].
4. American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 4ª ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins; 1999.
5. Chapuis Y, Fulla Y, Bonnichon P, Tarla E, Abboud B, Pitre J et al. .Values of ultrasonography, sestamibi scintigraphy, and intraoperative measurement of 1-84 PTH for unilateral neck exploration of primary hyperparathyroidism. World J Surg 1996; 20:835-839.
6. Mitchell BK, Merrell RC, Kinder BK. Localization studies in patients with Hyperparathyroidism. Surg Clin North Am 1995; 75:483-498.

7. Shana AR, Jaffe BM. Cervical exploration for primary Hyperthyroidism. *J Surg Oncol* 1993; 52: 14-17.
8. Harness JK, Organ CH, Thompson NW. Operative experience of US general surgery residents in thyroid and parathyroid disease. *Surgery* 1995; 118:1063-1070.
9. Shen W, Duren M, Morita E. Reoperation for persistent or recurrent primary hyperparathyroidism. *Arch Surg* 1996; 131: 861-869.
10. Borley NR, Collins REC, O'Doherty M. Technetium-99m sestamibi parathyroid localization is accurate enough for scan-directed unilateral neck exploration. *Br J Surg* 1996; 83:989-991.
11. Kaplan EL, Yashiro T, Salti G. Primary hyperparathyroidism in the 1990s. Choice of surgical procedures for this disease. *Ann Surg* 1992; 215:300-317.
12. O'Doherty MJ, Kettle AG, Wells P. Parathyroid imaging with technetium-99m-sestamibi: preoperative localization and tissue uptake studies. *J Nucl Med* 1992; 33:313-318.
13. O'Doherty MJ. Radionuclide parathyroid imaging. *J Nucl Med* 1997; 38:840-841.



14. Epstein S. The roles of bone mineral density, bone turnover, and other properties in reducing fracture risk during antiresorptive therapy. *Mayo Clin Proc* 2005; 80(3):379-388.
15. Abe-Amer Y. Advances in osteoclast differentiation and function. *Curr Drug Targets Immune Endocr Disord* 2005; 5(3):347-355.
16. Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteopor Int* 2002; 13:394-399.
17. Syed F, Khosla S. Mechanism of steroids effects on bone. *Biochem Bio Res Commun* 2005; 328:688-696.
18. Radi ZA, Khan NK. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflamm Res* 2005; 54(9):358-366.
19. Mezquita-Raya P, Muñoz Torres M, Luna JD, Luna V, López-Rodríguez F, Torres-Vela E, Escobar-Jiménez F. Relation between vitamin D insufficiency, bone density and bone metabolism in healthy postmenopausal woman. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1-8.
20. Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for the regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteopor Int* 2000; 11:905-913.

21. Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of the Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in the patogénesis and treatment of metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7):2355-2363.
22. Muñoz-Torres M, de la Higuera Lopez-Frias M, Fernández Garcia D. Advances in osteochlast biology: the osteoprotegerin-RANKL ligand system. *Med Clin (Barc)* 2004; 122(2):75-77.
23. Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 2001; 232:235-247.
24. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunston CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expresión in human osteoblastic cells. *Bone* 1999; 25:255-259.
25. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormona stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin Messenger ribonucleic acid expresión in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999; 140:3552-3561.
26. Gaddy-Kurten, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC. Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology* 2002; 143(1):74-83.

27. Varga F, Spitzer S, Klaushofer K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcio Tissue Int* 2004; 74(4):382-387.
28. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17- $\beta$  Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin (OPG)/osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) by a mouse stromal cell line ST-2. *J Bone Miner Res* 1999; 14(Suppl 1):FO95.
29. Fleish H, Russell RGG, Straumen F. Effects of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966; 212:901-903.
30. Sergeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature* 1979; 281:152-154.
31. Cons Molina F. Marcadores bioquímicos del remodelado óseo. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(3):91-98.
32. Price PA, Poser JW. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine bone. *Proc Nat Acad. USA* 1976; 73:3274-3375.
33. Malone JD, Teitelbaum SL. Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* 1982; 92:227-230.

34. Mundy GI, Poser JW. Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcif Tissue Int* 1983; 35:164-168.
35. Nacional Institute of Health. Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285:785-795.
36. World Health Organization (1994) Technical report: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO, Geneva, Switzerland.
37. National Osteoporosis Foundation. Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteoporos Int* 1998; 8(Suppl 4):S1.
38. Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(12):2076-2081.
39. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994; 94(5): 2130–2134.
40. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston CC. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989; 44(3):429–433.

41. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991; 6(6):561–567.
42. Hustmyer FG, Liu G, Johnston CC, Christian J, Peacock M. Polymorphism at an Sp1 Binding Site of COL1A1 and Bone Mineral Density in Premenopausal Female Twins and Elderly Fracture Patients. *Osteoporos Int* 1999; 9:346-350.
43. Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(12):2076-2081.
44. Keen RW, Snieder H, Molloy H, Daniels J, Chiano M, Gibson F, Fairbairn L, Smith P, MacGregor MJ, Gewert D, Spector TD. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor  $\beta$ 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins. *Rheumatology* 2001; 40: 48-54.
45. Heaney RP. Nutritional Factors in Osteoporosis. *Ann Rev Nutr* 1993; 13:287-316.
46. Ooms ME, Lips P, Van Lingen A, Valkenburg HA. Determinants of bone mineral density and risk factors for osteoporosis in healthy elderly women. *J Bone Miner Res* 1993; 8(6):669-675.

47. Guthrie JR, Ebeling PR, Dennerstein L, Wark JD. Risk factors for osteoporosis: prevalence, change, and association with bone density. *Medscape Womens Health* 2000; 5(5):E2.
48. Stevenson JC, Lees B, Devenport M, Cust MP, Ganger KF. Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis?. *BMJ* 1989; 298:924-928.
49. Liu YZ, Liu YY, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol* 2003; 177(2):147-196.
50. Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res* 2006; 21(10):1511-1535.
51. Jofré R. Plimorfismos del gen del receptor de la vitamina D (VDR) y función paratiroidea. *Nefrología* 2001; 21(S1):51-55.
52. Riancho Moral JA, González Macías. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. 1ª ed. Madrid: Jarpyo Editores S.A; 2004.
53. Haussler MR, Whitefield GR, Haussler CA, Hsieh JC, Thomson PD, Selznick SH, Enzinas-Dominguez C, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor:

- biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13(3):325-349.
54. Gómez-Alonso C, Naves-Díaz ML, Díaz-Corte C, Fernández-Martín JL, Cannata-Andía JB. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms: effect on bone mass, bone loss and parathyroid hormone regulation.
55. Université Paris Descartes. Direction des systemes d'information. GENATLAS: Gene Database. <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/> [Consulta 2007-07-24].
56. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini G, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 161:307-320).
57. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105:1879-82.
58. Taboulet J, Frenkian M, Frenco JL, Feingold N, Julliene A, de Vernejoul MC. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in post-menopausal women. *Hum Mol Genet* 1998; 7(13):2129-2133.
59. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetics factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 2000; 166:235-245.

60. Reza Albarrán AA, Vergara López A, Mendoza Zubieta V, Martínez Sibaja C, Zúñiga González S, Porias Cuéllar HL, Arechavaleta Granell R. Osteoporosis: posición de la sociedad mexicana de nutrición y endocrinología. *Endocrinología y Nutrición* 2004; 12(3):123-163.
61. McLean RR, Karasik D, Selhub J, Tucker KL, Ordovas JM, Russo GT, Cupples LA, Jacques PF, Kiel DP. Association of a common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bone phenotypes depends on plasma folate status. *J Bone Miner Res* 2004; 19:410–418.
62. Macdonald HM, McGuigan FE, Fraser WD, New SA, Ralston SH, Reid DM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interacts with riboflavin intake to influence bone mineral density. *Bone* 2004; 35:957–964.
63. Villarreal E, Bermúdez A. Análisis de los polimorfismos APO-E en mujeres colombianas con osteoporosis y correlación con variables clínicas y sociales de riesgo. *Biomédica* 2004; 24:50-55.
64. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Hosoi T, Inoue S, Kaneki M. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1438-1845.



65. Cauley JA, Zmuda JM, Jaffe K, Kuller LH, Ferrel RE, Wisniewski SR, Cummings SR. Apolipoprotein E polymorphism: a new genetic marker of hip fracture risk. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1175-1181.
66. Beaven SR, Prentice A, Stirling DM. Apolipoprotein E (APO-E) genotype and osteocalcin carboxylation postmenopause. *J Bone Miner Res* 1998; 13:523.
67. Urayama S. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide and staurosporine. *J Lab Clin Med* 2000; 136:181-193.
68. Gindler EM, King JD. Determination of calcium in plasma. *Am J Clin Pathol* 1972; 58:376-386.
69. Henry R. *Clinical chemistry: Principles and Thecnics*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Harper & Row; 1974.
70. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31:87-96.
71. Tietz NM, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurements of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21:731-748.

72. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Biología celular y molecular*. 5ª ed. New York: Panamericana; 2005.
73. Heat H, Hodgson SF, Kennedy MA. Primary hyperparathyroidism. Incidence, morbidity, and potential economic impact in a community. *New Eng J Med* 1980; 302:189-193.
74. Adami S, Marcocci C, Gatti D. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Europe. *J Bone Min Res* 2002; Suppl 2: N18-23.
75. Wermers RA, Koshla S, Atkinson EJ, Achenbach SJ, Oberg AL, Grany CS, Melton LJ. Incidence of primary hyperparathyroidism in Rochester, Minnesota, 1993-200: an update on the changing epidemiology of the disease. *J Bone Min Res* 2006; 21(1):171-177.
76. Guo CY, Thomas WE, al Dehaimi AW, Assiri AM, Eastell R. Longitudinal changes in bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3487-3491.
77. Christiansen P, Steinicke T, Brixen K, Hesse I, Melsen F, Charles P, Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism: biochemical markers and bone mineral density at multiple skeletal sites in Danish patients. *Bone* 1997; 21:93-99.

78. Moosgaard B, Vestergaard P, Heickendorff L, Melsen F, Christiansen P, Mosekilde L. Vitamin D status, seasonal variations, parathyroid adenoma weight and bone mineral density in primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2005; 63:506-513.
79. Moosgaard B, Christensen SE, Vestergaard P, Heickendorff L, Christiansen P, Mosekilde L. Vitamin D Metabolites and skeletal consequences in primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol* 2007; 68(5):707-715.
80. Parfitt AM. The action of parathyroid hormone on bone: Relations to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. Part I of IV parts: Mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis: Morphology and kinetic approaches to bone turnover. *Metabolism* 1976; 25:809-844.
81. Parfitt AM. The action of parathyroid hormone on bone: Relations to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. Part II of IV parts: PTH and bone cells: Bone turnover and plasma calcium regulation. *Metabolism* 1976; 25:909-955.
82. Parfitt AM. The action of parathyroid hormone on bone: Relations to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. Part III of IV parts: PTH and osteoblasts, the relationship between bone turnover and bone loss, and the state of the bones in primary hyperparathyroidism. *Metabolism* 1976; 25:1033-1069.

83. Parfitt, A.M. The action of parathyroid hormone on bone: Relations to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. Part IV of IV parts: The state of bone in uremic hyperparathyroidism – The mechanisms of skeletal resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism* 1976, 25, 1157-1188.
84. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone* 1986; 7:213-221.
85. Charles P, Mosekilde L, Taagehøj-Jensen F. Primary hyperparathyroidism: evaluated by <sup>47</sup>Calcium kinetics, calcium balance and serum bone GLa protein. *Eur J Clin Investigation* 1986; 16:277-283.
86. Martin P, Bergmann P, Gillet C, Fus M, Kinnaert P, Corvilain J, van Geertruyden J. Partially reversible osteopenia after surgery for primary hyperparathyroidism. *Arch Intern Med*, 1986; 146: 689-691.
87. Langub MC, Monier-Faugere MC, Qi Q, Geng Z, Koszewski NJ, Malluche HH. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Min Res* 2001; 16:448-456.
88. Faucheux C, Horton MA, Price JS. Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor

- activator of NF-kappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J Bone Min Res* 2002; 17:455-464.
89. Wada T, Nakashima T, Hiroshi, N, Phenninger JM. RANKL-RANK signalling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12:17-25.
90. Charon SA, Eduard CM, Arlot M, Meunier PJ. Effects of parathyroid hormone on remodeling of iliac trabecular bone packets in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Ortho Relat Res* 1982; 162:255-263.
91. Silverberg SJ, Shane E, de la Cruz L, Dempster DW, Feldman F, Seldin D, Jacobs TP, Siris ES, Cafferty M, Parisien MV. Skeletal disease in primary hyperparathyroidism. *J Bone Min Res* 1989; 4:283-291.
92. Parisien M, Mellish RW, Silverberg SJ, Shane E, Lindsay R, Bilezikian JP, Dempster DW. Maintenance of cancellous bone connectivity in primary hyperparathyroidism: trabecular strut analysis. *J Bone Min Res* 1992; 7:913-919.
93. Vogel M, Hahn M, Delling G. Trabecular bone structure in patients with primary hyperparathyroidism. *Virchows Archiv* 1995; 426:127-134.
94. Dempster DW, Parisien M, Silverberg SJ, Liang XG, Schnitzer M, Shen V, Shane E, Kimmel DB, Recker R, Lindsay R, Bilezikian JP. On the mechanism

of cancellous bone preservation in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1562-1566.

95. Steinicke T, Christiansen P, Vesterby A, Ullerup R, Hesse I, Mosekilde L, Melsen F. Primary hyperparathyroidism: Bone structure, balance, and remodeling before and 3 years after surgical treatment. *Bone* 2000; 26:535-543.

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

97. McDermott MT, Perloff JJ, Kidd GS. Effects of mild asymptomatic primary hyperparathyroidism on bone mass in women with and without estrogen replacement therapy. *J Bone Min Res* 1994; 9:509-514.

98. Adami S, Braga V, Squaranti R, Rossini M, Gatti D, Zamberlan N. Bone measurements in asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Bone* 1998; 22:565-570.

99. Christiansen P, Steinicke T, Brixen K, Hesse I, Melsen F, Heickendorff L, Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism: Short-term changes in bone remodeling and bone mineral density following parathyroidectomy. *Bone* 1999; 25:237-244.

100. Christiansen P, Steinicke T, Brixen K, Hesse I, Melsen F, Heickendorff L, Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy on regional bone mineral density in Danish patients: A three year follow-up study. *Bone* 1999; 25:589-95.
101. Kaji H, Nomura R, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. The usefulness of bone metabolic indices for the prediction of changes in bone mineral density after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *Horm Metab Res* 2006; 38:411-416.
102. Luisa Álvarez, Pilar Peris. Marcadores bioquímicos del remodelado óseo: Aplicabilidad clínica. Edición limitada. Roche Diagnostics, 2002.
103. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biochemical markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996; 17:333-368.
104. Ivaska KK, Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Bone resorption releases immunoreactive osteocalcin from bone matrix in vitro. *Bone* 2001; 28:S159.
105. Rao D, Phillips ER, Divine GW, Talpos GB. Randomized controlled trial of surgery vs no-surgery in patients with mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5415-5422.

106. Bollerslev J, Jansson S, Mollerup CL, Nordenström J, Lundgren E, Tørring O, Varhaug JE., Baranowski M, Aanderud S, Franco C, Freyschuss B, Isaksen GA, Ueland T, Rosen T. Medical observation, compared with parathyroidectomy, for asymptomatic primary hyperparathyroidism: a prospective, randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1687- 1692.
107. Ambrogini E, Cetani F, Cianferotti L, Vignali E, Banti C, Viccica G, Oppo A, Miccoli P, Berti P, Bilezikian JP, Pinchera A, Marcocci C. Surgery or surveillance for mild asymptomatic primary hyperparathyroidism: A prospective, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3114-3121.
108. Hagström E, Lundgren E, Mallmin H, Rastad J, Hellman P. Positive effect of parathyroidectomy on bone mineral density in mild asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Intern Med* 2006; 259:191-198.
109. Carling T, Ridefelt P, Hellman P, Rastad J, Akerström G. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6):1772-1775.
110. Carling T, Rastad J, Akerström G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(7):2255-2259.



111. Correa P, Rastad J, Schwarz P, Westin G, Kindmark A, Lundgren E, Akerström G, Carling T. The vitamin D receptor (VDR) start codon polymorphism in primary hyperparathyroidism and parathyroid vdr messenger ribonucleic acid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(5):1690-1694.
112. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *PNAS* 1992; 89:6665–6659.
113. Sheehan D, Bennett T, Cashman KD. An assessment of genetic markers as predictors of bone turnover in healthy adults. *J Endocrinol Inves* 2001; 24:236–245.
114. Garnero P, Borel O, Grant SF, Ralston SH, Delmas PD. Collagen I1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Min Res* 1998; 13:813–817.
115. Eccleshall TR, Garnero P, Gross C, Delmas PD, Feldman D. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. *J Bone Min Res* 1998; 13:31–35.
116. Hansen TS, Abrahamsen B, Henriksen FL, Hermann AP, Jensen LB, Horder M, Gram J. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral

- density or bone loss in Danish perimenopausal women. *Bone* 1998; 22:571–575.
117. Jorde R, Bønaa KH, Sundsfjord J. Primary hyperparathyroidism detected in a health screening: The Tromsø study. *J Clin Epidem* 2000; 53:1164-1169.
118. Hesp R, Téllez M, Davidson L, Elton A, Reeve J. Trabecular and cortical bone in the radic of women with parathyroid adenomata. *Bone Mineral* 1987; 2:301-310.
119. Martin P, Bergmann P, Gillet C, Fuss M, Kinnaert P, Corvilain J, van Geertruyden J. Partially reversible osteopenia after surgery for primary hyperparathyroidism. *Arch Intern Med* 1986; 146:689-691.
120. Seeman E, Wahner HW, Offord KF, Kumar R, Johnson WJ, Riggs BL. Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and appendicular skeleton. *J Clin Invest* 1982; 69:1302-1309.
121. Mautalen C, Romero H, Ghiriughelli G, Fromm G. Cortical bone mineral content in primnary hyperparathyroidism. Changes after parathyroidectomy. *Acta Endocrinol* 1986; 111:494-497.

122. Wishart J, Horowitz M, Need A, Nordin BE. Relationship between forearm and vertebral mineral density in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Arch Intern Med* 1990; 150:1329-1331.
123. Minisola S, Rosso R, Romagnoli E, Pacitti Mt, Scarnecchia L, Carnevale V, Mazzuoli G. Trabecular bone mineral density in primary hyperparathyroidism: relationship to clinical skeletal turnover. *Bone Mineral* 1993; 20:113-123.
124. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone* 1986; 7:213-221.
125. Van Doorn L, Lips P, Netelenbos JC, Hackengt WHL. Bone histomorphometry and serum intact PTH (184) in hyperparathyroid patients. *Calcif Tissue Int* 1989; 44 S:N36.
126. Delmas PD, Meunier PJ, Faysse E, Saubier EC. Bone histomorphometry and serum bone glaprotein in the diagnosis of primary hyperparathyroidism. *World J Surg* 1986; 10:572-8.
127. A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. Silverberg JS, Shane E, Jacobs TP, Siris E, Bilezikian JP. *New Eng J Med* 1999; 341(17):1249-1255.

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