TESIS DOCTORAL

Polimorfismos de los genes reguladores de la angiogénesis en la Enfermedad Ósea de Paget

Ismael Calero Paniagua

2015

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

Polimorfismos de los genes reguladores de la angiogénesis en la Enfermedad Ósea de Paget.

Ismael Calero Paniagua

2015

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Dr D. Javier del Pino Montes

Dr. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DR. D. JAVIER DEL PINO MONTES, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "Polimorfismos de los genes reguladores de la angiogénesis en la Enfermedad Ósea de Paget", que presenta el doctorando D. Ismael Calero Paniagua, ha sido realizado bajo su codirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 9 de diciembre de 2015.

Dr. D. Rogelio González Sarmiento Dr. D. Javier del Pino Montes

A Ricardo, “Usa”, por su ayuda incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los Drs. Javier del Pino Montes y Rogelio González Sarmiento, por la confianza que pusieron en mí para llevar a cabo este trabajo, por sus ánimos, y por su disponibilidad a pesar de sus apretadas agendas.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital General Virgen de la Luz de Cuenca y del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Salamanca, por enseñarme el arte de la medicina.

Gracias al Dr. José Antonio Nieto Rodríguez y a los compañeros que me ayudaron con el trabajo de Doctorado hace ya unos años.

Gracias a Judith y a Luis, por empezar y proseguir con la elaboración de la base de datos que otros hemos podido completar hasta tener más de 300 muestras de DNA de pacientes con Enfermedad Ósea de Paget.

Gracias a Nuria, Pilar, Mercedes e Inés, por la logística.

Gracias a todo el equipo del laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, por ayudarme con el trabajo “de campo” y por no cansarse de repetirme cómo se hacían las cosas una y otra vez.

Gracias al Dr. Ralston y al equipo del laboratorio de la Unidad de Enfermedades Reumáticas del Instituto de Genéticia y Medicina Molecular del Western General Hospital de Edimburgo, por darme la oportunidad de trabajar con ellos.

Gracias a Carlis, por su ayuda con el diseño gráfico.

Gracias a Joaquín y a Nerea, por su ayuda con la traducción.

Gracias a mis amigos y familia, a los que están y a los que se fueron, por haber estado ahí.

Gracias a Cristina, por todo.

Gracias, sobre todo, a los verdaderos protagonistas de este trabajo, los pacientes, por su desinteresada colaboración.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

-**Ismael Calero Paniagua**, Ricardo Usategui Martín, Tatiana Carranco Medina, María Dolores Sánchez González, Alba Quesada Moreno, Laura Pérez Garrido, Guadalupe Manzano Canabal, Carlos Montilla Morales, Cristina Hidalgo Calleja, Olga Martínez González, Rogelio González Sarmiento, Javier del pino Montes**. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ENDOTELINA 1 EN LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET.** XX CONGRESO SEIOMM. Bilbao, 211 a 23 de octubre de 2015.

-I. Calero Paniagua, R. Usategui-Martín, T. Carranco Medina, M.D. Sánchez González, A. Quesada Moreno, L. Pérez Garrido, C. Montilla Morales, C. Hidalgo Calleja, O. Martínez González, S. Gómez Castro, R. González Sarmiento y J. del Pino Montes. **ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE VEGFA Y VEGFAR EN LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET.** XLI CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Sevilla, 20 a 22 de mayo 2015.

-**Calero I**, Usategui R, Carranco T, Sánchez MD, Quesada A, Montilla C, Hidalgo C, Martínez O, Sarmiento R, Pino J del. **ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE VEGFA Y VEGFAR EN LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET.** XIX CONGRESO SEIOMM. Santiago de Compostela, 5 a 7 de noviembre 2014.

-Proyecto de investigación GRS 969/A/14: **IMPLICACIÓN DE DIFERENTES FACTORES ANGIOGÉNICOS EN LA PRESENCIA Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET.** IP: Javier del Pino. Periodo 01/01/2014 a 30/06/2015.

SUMMARY

Paget's disease of bone (EOP) is a skeletal, focal and chronic disorder of unknown cause in which the number, size and activity of osteoclasts are increased, and an accelerated bone remodeling occurs. The resulting bone tissue is immature and not laminar, highly vascular, with higher volume and lower resistance. At present, the hypothesis of synergistic actions of environment and genetic factors is accepted to explain the origin of PDB.

Bone is a complex tissue composed of several cell types that undergo a continuous renewal and repair process termed "bone remodeling". Despite the need of an adequate vascularization for bone remodeling, it is not well konwn if the primary control of angiogenesis in the bone is intrinsic to osteoblasts, osteoclasts or to certain populations of ECs. Although vascularization temporally precedes bone formation, it would be possible that angiogenesis is driven primarily by factors released by osteoblasts, osteoclasts or osteocytes.

The key factor molecules involved in angiogenesis are Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF receptor (VEGFR), Nitric Oxide (NO) and Endothelin (ET).

VEGF plays a critical role in bone development, in disorders of bone remodeling such as osteoporosis, and in bone repair. Some authors hypothesize that specific vessels within the haversian system are able to express VEGF

ET1 promotes bone formation and two studies associated ET1 levels with PDB.

Endothelial NO Synthase (eNOS) probably represents the main NOS isoform in the regulation of bone formation.

We consider that PDB hypervascularization expresses an alteration of bone angiogenesis which accompanies osteoclastogenesis and the development of the basic multicellular unit. For this reason, we have carried out a study of different genetic variants related to the process of angiogenesis in patients with PDB in order to identify any association with the development of PDB or with its phenotypic expression.

We have studied 264 patients diagnosed with PDB.

125 sex-matched healthy subjects over 40 years old without previous history of PDB were recruited as healthy controls. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) rs699947 and rs833061 within VEGFA gene, rs2071559 within VEGFR2 gene, rs530 in ET1 gene and rs2070744 within eNOS gene was performed using TaqMan® 5´-exonuclease allelic discrimination assays (Applied Biosystems®).

We found that AC genotype of rs699947 and CT genotype of rs833061, both located within VEGFA gene, were associated with skull involvement. We also found significant association between CC genotype of rs699947 and an older age at diagnosis.

We found statistically significant differences in genotype distribution of variant rs 2071559 within VEGFR2 gene between PDB patients and controls. Homozygous CC genotype and allele C were associated with an increased risk of developing PDB. The same genotype was associated with increased risk of developing disease complications.

The analysis of the ET1 variant rs5370 showed an association of the TT genotype with an increased risk of developing familial PDB and with an inactive disease at time of diagnosis.

Analysis of the eNOS variant rs2070744 showed that allele C was associated with an active disease at diagnosis.

Our study shows for the first time that rs2071559 located within VEGFR2 gene is associated with an increased susceptibility to develop PDB and its complications, which reinforces the importance of the involvement of vascular factors in the development of the disease.

Furthermore, rs3070 in ET1 gene is related to the development of familial PDB in our cohort, supporting a genetic predisposition to the disease.

Finally, there is an association of rs699947 and rs833061 within VEGFA gene, rs2071559 in VEGFR2 gene, rs5370 in ET1 gene and rs2070744 within eNOS gene with the PDB phenotype, in relation to the involvement of certain bones and the natural history of this disease, so, we assume that certain features of the disease may also have a genetic basis related to changes that affect angiogenesis.

It is an important step forward towards the understanding of this disease.

Further studies are needed to learn about the specific mechanisms that links the gene modifications with the disease.

ABREVIATURAS

BMP:	Proteínas Morfogénicas Óseas
BSF:	Bisfosfonato
CE:	Célula endotelial
CFU-GM:	Unidades Formadoras de Colonias Gránulo Monocíticas
CFU-S:	Unidades Formadoras de Colonias Esplénicas
CMH:	Célula Madre Hematopoyética
CMM:	Célula Madre Mesenquimal
CSF1:	Factor Estimulante de Colonias 1
DC-STAMP:	Proteína Transmembrana Específica de Célula Dendrítica
DMO:	Densidad Mineral Ósea
ECM:	Matriz Extracelular
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
eNOS:	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
EOP:	Enfermedad Ósea de Paget
FA:	Fosfatasa Alcalina
FGF2:	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
FN kB:	Factor Nuclear kB
HIF-1:	Factor Inducible por Hipoxia
IL:	Interleucina
ILGF:	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
IFN:	Interferón

iNOS:	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
M-CSF:	Factor Estimulante de las Colonias de Macrófagos
MMP:	Matriz Metaloproteinasa
MRO:	Marcadores de Remodelado Óseo
NO:	Óxido Nítrico
NOS:	Óxido Nítrico Sintasa
nNOS:	Óxido Nítrico Sintasa Neuronal
OPG:	Osteoprotegerina
OPTN:	Optineurina
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGF:	Factor de Crecimiento Placentario
PINP:	Propéptido del Colágeno I
PTH:	Hormona Paratiroidea
RANK:	Receptor Activador del Factor Nuclear κB
RANKL:	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κB
SOST:	Esclerostina
SNP:	Polimorfismo de Nucleótido Simple
SQSTM1:	Sequestosoma 1
TGFβ:	Factor Transformante β
TNFα:	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNFRSF11A:	Receptor de la Superfamilia del TNF-11A

UBA:	Ubiquitina
VEGF:	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VEGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
ZOL:	Ácido zoledrónico
ZiPP:	Zoledronate in the Prevention of Paget´s disease

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

1 Enfermedad Ósea de Paget. 3

1.1 Reseña histórica. 3

1.2 Epidemiología. 4

1.3 Etiología. 5
1.3.1 Factores ambientales. 5
1.3.2 Factores genéticos. 6
1.3.3 Modelo integrado. 8

1.4 Patogénesis. 8

1.5 Manifestaciones clínicas. 9

1.6 Complicaciones. 11
1.6.1 Artropatía secundaria por vecindad. 11
1.6.2 Fracturas. 11
1.6.3 Complicaciones neurológicas. 11
1.6.4 Afectación bucodental. 12
1.6.5 Complicaciones cardiovasculares. 12
1.6.6 Alteraciones del metabolismo del fósforo y del calcio. 12
1.6.7 Tumores óseos. 12

1.7 Diagnóstico. 12
1.7.1 Marcadores de recambio óseo (MRO). 13
1.7.2 Radiología simple. 13
1.7.3 Gammagrafía ósea. 16
1.7.4 Biopsia. 16

1.8 Tratamiento. 17
1.8.1 Indicaciones. 17
1.8.2 Fármacos. 18
1.8.3 Cirugía. 19
1.8.4 Evaluación de la eficacia. 20

2 Remodelado óseo y angiogénesis. 21

2.1 Fisiopatología del remodelado óseo. 21

2.2 Acoplamiento entre la angiogénesis y el metabolismo óseo. ... 26

3 Principales reguladores de la angiogénesis. 31

3.1 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptor de VEGF (VEGFR)..... 31
3.1.1 VEGF, VEGFR y hueso..... 34
3.1.2 VEGF, VEGFR y osteoblastos. 34
3.1.3 VEGF y osteoclastos..... 39
3.1.4 VEGF, VEGFR y EOP. 41

3.2 Endotelina (ET)..... 41
3.2.1 Endotelina 1 y hueso..... 42
3.2.2 Endotelina 1 y osteoblastos..... 42
3.2.3 Endotelina 1 y osteoclastos..... 43
3.2.4 Endotelina 1 y EOP. 43

3.3 Óxido nítrico..... 44
3.3.1 Óxido nítrico sintasa..... 44
3.3.2 Expresión de NOS en el hueso. 45
3.3.3 Efectos de NO en el hueso..... 46
3.3.4 Efectos de NO en osteoblastos y osteocitos. 47
3.3.5 Efectos de NO en osteoclastos. 48
3.3.6 eNOS y EOP. 49

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 51

PACIENTES Y MÉTODOS 55

1 Pacientes y controles..... 57

1.1 Criterios de selección..... 57

1.2 Definiciones..... 57
1.2.1 Diagnóstico probado de EOP. 57
1.2.2 Definición de enfermedad activa. 58
1.2.3 Definición de enfermedad inactiva. 58

2 Método. 59

2.1 Recogida de datos..... 59

2.2 Aislamiento del DNA de alto peso molecular..... 60
2.2.1 Obtención de muestras de sangre periférica..... 60
2.2.2 Obtención de células mononucleadas de sangre periférica. 61
2.2.3 Aislamiento del DNA de alto peso molecular..... 61
2.2.4 Purificación del DNA..... 61

2.2.5 Cuantificación del DNA..... 62

2.3 Discriminación alélica de SNP mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas TAQMAN®. 62

2.4 SNPs estudiados..... 66

2.5 Análisis estadístico. 66

RESULTADOS..... 69

1 Datos clínicos y epidemiológicos. 71

2 Estudio genético. 74

DISCUSIÓN 97

1 Datos clínicos y epidemiológicos de nuestra cohorte de EOP..... 101

2 Estudio genético. 102

2.1 Gen VEGFA..... 102

2.2 Gen VEGFR2..... 106

2.3 Gen ET1. 109

2.4 Gen eNOS. 111

3 Áreas de aplicación y directrices para futuras investigaciones..... 114

4 Limitaciones del estudio..... 116

CONCLUSIONES 117

BIBLIOGRAFÍA 121

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Primer paciente diagnosticado de osteítis deformante..... 4

Fig.2. Funciones de la proteína p62 en los osteoclastos. 7

Fig.3. Mecanismo de activación de los osteoclastos en pacientes con mutación del SQSTM1 7

Fig.4. Deformidad clínica y radiológica del radio en paciente con EOP. 10

Fig.5. Tibia “en sable” en paciente con EOP. 10

Fig.6. Afectación de tibia en paciente con EOP. 15

Fig.7. Vértebra en marco en paciente con EOP. 15

Fig.8. Gammagrafía ósea en paciente con EOP y afectación de fémur, pelvis y columna lumbar 16

Fig.9. Biopsia ósea de paciente con EOP de larga evolución. 17

Fig.10. Esquema del remodelado óseo. 21

Fig.11. Proceso de diferenciación, fusión y maduración del osteoclasto. 22

Fig.12. Efectos de los factores hormonales sobre RANKL y OPG..... 23

Fig.13. Proceso de diferenciación de los osteoblastos. 24

Fig.14. Interacción entre osteocitos, osteoclastos y osteoblastos durante el remodelado óseo. 25

Fig.15. Esquema de la unidad de remodelado en el hueso cortical. 27

Fig.16. Esquema de la unidad de remodelado en el hueso trabecular..... 27

Fig.17. Factores angiogénicos producidos en la unidad de remodelado óseo..... 29

Fig.18. Modelo hipotético que muestra la regulación de la angiogénesis por osteoblastos, osteoclastos y osteocitos 30

Fig.19. Esquema de los 3 receptores de VEGF 33

Fig.20. Acciones de VEGF sobre la célula endotelial..... 33

Fig.21. Regulación del acoplamiento entre la angiogénesis y la osteogénesis mediada por HIF y VEGF 36

Fig.22. Factores que estimulan la formación de VEGF por parte del osteoblasto maduro y su relación con CEs y osteoclastos..... 37

Fig.23. Regulación autocrina de VEGF en los osteoblastos 38

Fig.24. Diferenciación de MSC a osteoblasto por VEGF 38

Fig.25. Efectos de VEGF sobre el osteoclasto y liberación de VEGF de la ECM por la resorción ósea 40

Fig.26. Efectos de ET1 en la pared vascular..... 41

Fig.27. Mecanismo de la reacción PCR con sondas TaqMan®. Tomado de www.appliedbiosystems.com. 64

Fig.28. Fases del programa utilizadas en el termociclador. …… 65

Fig.29. Discriminación alélica del polimorfismo -604T>C (rs2071559)..... 66

Fig.30. Frecuencia de afectación de los distintos huesos en nuestra cohorte de EOP….. 73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.1. Imágenes características en la radiografía de la EOP. 14

Tabla.2. Evolución de la lesión radiológica en la EOP. 14

Tabla.3. BSFs usados en el tratamiento de la EOP. 19

Tabla.4. Índice anatómico de Renier. 60

Tabla.5. Espectros de excitación y emisión de las sondas VIC® y FAM® 63

Tabla.6. SNPs estudiados. 66

Tabla.7. Datos epidemiológicos y clínicos. 72

Tabla.8. Distribución de los genotipos entre controles y pacientes con EOP. 75

Tabla.9. Distribución de los alelos entre controles y pacientes con EOP. 76

Tabla.10. Distribución de los genotipos entre EOP esporádica y familiar. 77

Tabla.11. Distribución de los alelos entre pacientes con EOP esporádica y familiar. 78

Tabla.12. Distribución genotípica entre los paciente con EOP dependiendo del grado de actividad en el momento del diagnóstico. 79

Tabla.13. Frecuencia alélica entre pacientes con EOP activa o inactiva en el momento del diagnóstico. 80

Tabla.14. Frecuencias genotípicas entre EOP monostótica o poliostótica. 81

Tabla.15. Distribución de los alelos entre EOP monostótica o poliostótica. 82

Tabla.16. Frecuencias genotípicas de los pacientes con o sin afectación craneal. 83

Tabla.17. Distribución alélica en los pacientes EOP con o sin afectación de cráneo. 84

Tabla.18. Distribución por genotipos en función de la presencia de complicaciones. 85

Tabla.19. Distribución alélica en los pacientes con EOP que presentan o no complicaciones. 86

Tabla.20. Distribución genotípica entre los pacientes según presenten o no fractura. 87

Tabla.21. Distribución alélica de los pacientes con EOP con o sin fractura. ... 88

Tabla.22. Distribución genotípica dependiendo de presencia lesión de par craneal..... 89

Tabla.23. Frecuencias alélicas de los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de lesión de par craneal. 90

Tabla.24. Frecuencias genotípicas dependiendo de la presencia de coxopatía... 91

Tabla.25. Frecuencia alélica dependiendo de la presencia o no de coxopatía….. 92

Tabla.26. Distribución genotípica en función de la edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad. 93

Tabla.27. Distribución genotípica en función del número de veces que supera FA el límite superior de la normalidad. 94

Tabla.28. Frecuencias genotípicas de los pacientes con EOP y número de huesos afectados. 95

Tabla.29. Frecuencias genotípicas de los pacientes con EOP e índice de Renier 96

INTRODUCCIÓN

1 Enfermedad Ósea de Paget.

La enfermedad ósea de Paget (EOP) es un trastorno esquelético, crónico y focal, de causa desconocida, que se suele diagnosticar a partir de los 60 años. El número, tamaño y actividad de los osteoclastos están aumentados, y se produce un remodelado óseo acelerado. El tejido óseo resultante es inmaduro y no laminar, muy vascularizado, aumentado de volumen y con resistencia disminuida (Ralston et al. 2012).

1.1 Reseña histórica.

Puede que la EOP exista desde que los primeros vertebrados poblaban la tierra. Recientemente se han descrito las alteraciones óseas características de la EOP en una vértebra de Dysalotosaurus lettowvorbecki, un dinosaurio de la era jurásica, lo que hipotéticamente situaría los orígenes de la enfermedad en 150 millones de años (Witzmann et al. 2011).

El primer caso descrito, un varón de 46 años con deformidad de tibia izquierda, se publicó en 1876 por Sir James Paget quien consideró que se trataba de un problema óseo inflamatorio y lo denominó “osteitis deformans” (figura 1). Con el paso de los años desarrolló deformidad craneal, sordera y, finalmente, un osteosarcoma en el radio izquierdo a causa del cual falleció a los 68 años (Paget 1876). Años después, Paget presentó nuevos casos describiendo la entidad como una enfermedad que “*comienza en la edad media de la vida o después y afecta con más frecuencia a los huesos largos de las extremidades inferiores, la pelvis y el cráneo. Los huesos se agrandan y se hacen más maleables, y aquellos que soportan peso llegan a curvarse de forma antinatural*”(Paget 1882).

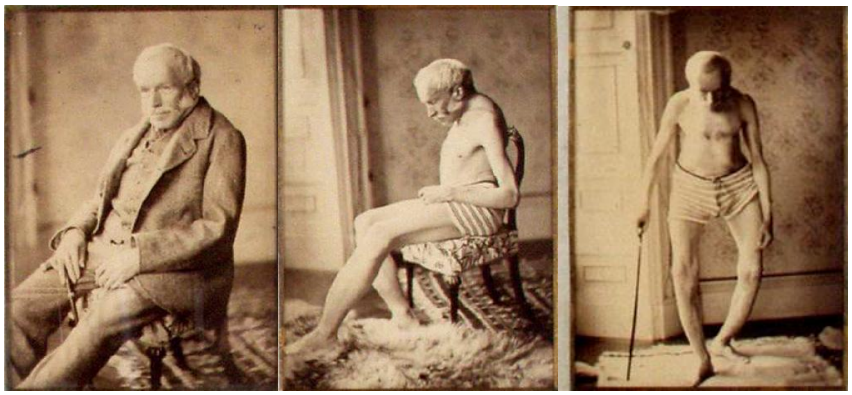

Fig.1. Primer paciente diagnosticado de osteítis deformante. Tomado de Paget 1876.

1.2 Epidemiología.

Actualmente, la EOP es la enfermedad metabólica ósea más frecuente tras la osteoporosis. Suele diagnosticarse por encima de los 60 años, y es rara por debajo de los 40, predominando ligeramente en los varones (Davie et al. 1999).

Tiene una distribución geográfica irregular y ha sido descrita en casi todos los lugares del planeta (Cooper et al. 1999; Corral-Gudino et al. 2013). Es una enfermedad que afecta principalmente a pacientes de ascendencia británica. Así, la enfermedad es frecuente (en torno al 4 %) en Inglaterra (van Staa et al. 2002), áreas de Australia, Nueva Zelanda (Reasbeck et al. 1983) o Norteamérica (Guyer et al. 1980) y rara (menos del 1 ‰) en África (Dahniya 1987), Asia o la península escandinava.

En España la prevalencia está en torno a 1,2 % de la población mayor de 55 años. Resultados previos de nuestro grupo demostraron una prevalencia del 1,7% en la provincia de Salamanca (Del Pino et al. 1986; Del Pino-Montes et al. 2009).

Además de la peculiar distribución de la enfermedad entre los distintos países, en de cada uno de ellos existen diferencias marcadas entre regiones vecinas, pues existen regiones donde se produce una acumulación significativa de casos (focos de alta prevalencia). El foco más conocido es el de Lancashire, con una prevalencia en la población mayor de 55 años del 7% (Barker et al.

1980). En España son varios los focos de alta prevalencia descritos: Sierra de La Cabrera-Madrid 6,4% (Morales et al. 1990) o Vitigudino-Salamanca 5,7% (Miron-Canelo et al. 1997).

En algunos de los focos españoles se han postulado diversos factores epidemiológicos (consumo de aguas no tratadas, consumo de carne de bóvidos no controlada sanitariamente, contacto con perros) como posibles contribuyentes a la alta frecuencia de casos. Estos podrían ser origen y fuente de un hipotético factor exógeno necesario para el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, es característico en los focos españoles un cierto aislamiento geográfico y una notable endogamia, lo que, junto a la alta incidencia de casos familiares en dichas zonas, apoya la presencia de un componente hereditario en la génesis de la enfermedad.

Diversos estudios sugieren que la prevalencia y la gravedad de la EOP están disminuyendo en la mayor parte de las regiones estudiadas. Su frecuencia parece estar disminuyendo en las regiones conocidas de alta prevalencia, pero no ocurre lo mismo en todas las zonas analizadas. Se han propuesto algunos motivos posibles, como cambios de los patrones migratorios, mejoría de la alimentación, estilo de vida sedentario o disminución de las infecciones (Corral-Gudino et al. 2013).

1.3 Etiología.

A lo largo de los años se han expuesto múltiples hipótesis para tratar de explicar el origen de la EOP. Las causas no son bien conocidas y existen algunas controversias. Se considera actualmente una enfermedad multifactorial con participación de factores ambientales y genéticos.

1.3.1 Factores ambientales.

Su distribución irregular y los cambios en su incidencia apoyan la participación de factores ambientales.

La hipótesis de una infección vírica persistente surgió al observar en los osteoclastos inclusiones intracelulares similares a las nucleocápsides de los

paramyxovirus (Rebel et al. 1974; Rebel et al. 1980). Sin embargo, a lo largo de los años, la validez de esta teoría ha sido puesta en duda por múltiples equipos de investigadores (Helfrich et al. 2000), ya que estas formaciones intracelulares podrían ser el resultado de una alteración en la autofagia (Hocking et al. 2010; Del Pino-Montes et al. 2007). También se han relacionado con otros factores, como dietas pobres en calcio y déficit de vitamina D en la infancia, consumo de carne de vacuno no controlada en la infancia (Morales et al. 1988) o consumo de aguas no purificadas (Miron-Canelo et al. 1997), contacto con perros durante la infancia o juventud (Holdaway et al. 1990), excesiva carga mecánica sobre el esqueleto, y diversos tóxicos ambientales (Lever 2002).

1.3.2 Factores genéticos.

Desde que en 1904 se publicara el primer caso familiar de EOP, múltiples estudios han sugerido la presencia de un componente hereditario en la etiopatogenia de la enfermedad.

Existe una fuerte tendencia a la agregación familiar que varía según las fuentes entre el 15 y el 30% (Seton et al. 2003; Tan et al. 2014). El riesgo relativo de padecer la enfermedad es 7 veces superior entre los familiares de pacientes con la enfermedad (Siris et al. 1991). El patrón de herencia es autosómico dominante con alta penetrancia y mecanismo multifactorial, que no puede justificarse por una sola mutación genética.

El gen que ha mostrado mayor susceptibilidad es el Sequestosoma-1 (SQSTM1) (Albagha et al. 2013; Layfield et al. 2004), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), que codifica la proteína p62. En ella confluyen las vías de señalización de los receptores de interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa B (NF-kB) (RANKL) (Geetha et al. 2002) (figura 2). Se han identificado diversas mutaciones, hasta en el 50 % de casos familiares y en el 15 % de los esporádicos, localizadas en el dominio de unión a ubiquitina (UBA) (Layfield et al. 2004; Michou et al. 2006; Ralston et al. 2012). Además, se ha conseguido un modelo murino de EOP por manipulación genética (Daroszewska et al. 2011).

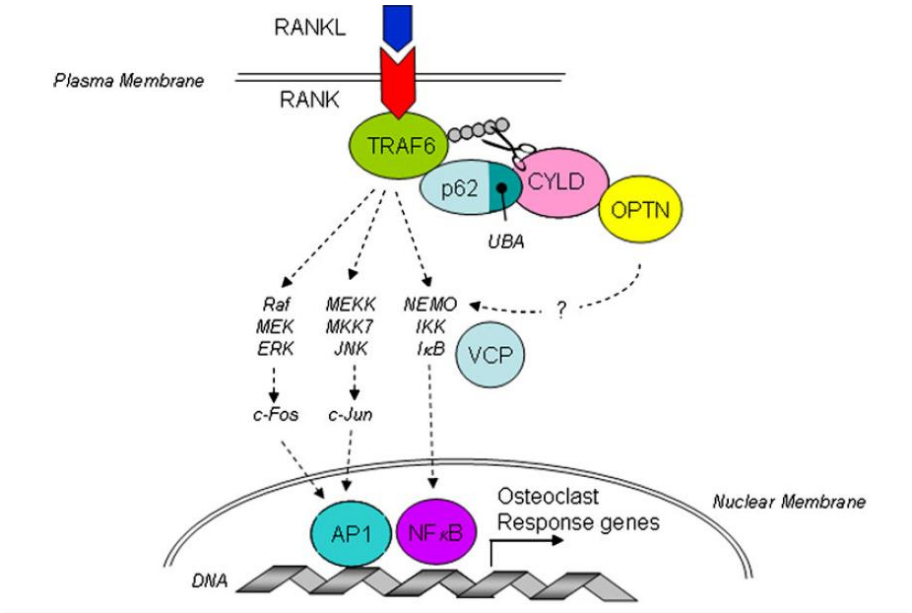

Fig.2. Funciones de la proteína p62 en los osteoclastos. Tomado de Ralston et al 2012.

Variaciones en la proteína p62 causan un desacoplamiento en la activación de la ruta NF-kB que se traduce en un gran incremento de la osteoclastogénesis, base patogénica del desarrollo de la EOP (figura 3) (Hocking et al. 2004).

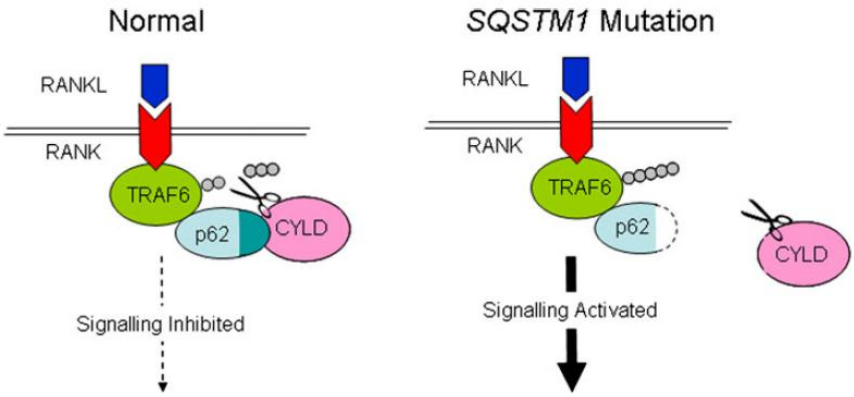

Fig.3. Mecanismo de activación de los osteoclastos en pacientes con mutación del SQSTM1. Tomado de Ralston et al 2012.

Otros genes candidatos para el desarrollo de EOP son: el factor estimulante de colonias 1 (CSF1), que codifica el factor estimulante de las

colonias de macrófagos (M-CSF); el TNSRSF11A, que codifica el receptor activador del factor nuclear Kappa β (RANK); el OPTN que codifica la optineurina (OPTN) y el TM7SF4 que codifica la proteína transmembrana específica de célula dendrítica (DC-STAMP) (Albagha et al. 2010). Además de éstos, recientemente, nuestro grupo de investigación también ha relacionado distintitos genes implicados en el proceso de la autofagia como candidatos para desarrollar la enfermedad: ATG16L1, ATG5 y ATG10 (Usategui-Martín et al. 2015).

1.3.3 Modelo integrado.

Ninguna de las dos teorías anteriormente expuesta puede explicar por sí sola la patogénesis de la EOP. Por este motivo, en la actualidad se acepta la hipótesis que considera la EOP como el resultado de la actuación sinérgica de factores ambientales y genéticos. En una edad temprana, los precursores osteoclásticos podrían ser sensibilizados por un factor ambiental aún no conocido. El condicionamiento genético explicaría la susceptibilidad individual para acabar desarrollando o no la enfermedad años después (Reddy 2004; Vallet et al. 2015).

1.4 Patogénesis.

Tres moléculas participan en la diferenciación, proliferación y activación osteoclástica: RANK, codificado por el gen del receptor de la superfamilia del TNF-11A (TNFRSF11A), RANKL, codificado por el gen TNFSF11, y osteoprotegerina (OPG), codificada por el gen TNFRSF11B.

En la EOP los osteoclastos tienen una sensibilidad aumentada para RANKL, con el resultado de un aumento de la activación de los osteoclastos. El recambio óseo está acelerado, con un aumento exagerado de la resorción ósea, seguido de una rápida formación ósea “compensadora” de la misma intensidad. El resultado es un hueso inmaduro, desorganizado y no laminar, con numerosas líneas de cementación en “mosaico” que alterna el tejido cortical con secciones irregulares de patrón trabecular (“woven bone”). La mineralización es normal. Los huesos afectados están aumentados de tamaño

y son menos compactos, más vascularizados y susceptibles a la fractura o la deformación. Con el paso del tiempo, la hipercelularidad disminuye y permanece un hueso escleroso, poco activo. A esta última fase se la denomina Paget “quemado” o agotado. En la evolución de cada lesión ósea se distinguen tres etapas: la osteolítica con predominio osteoclástico, la mixta, en la que coinciden lesiones líticas y escleróticas, y la tercera fase con predominio de la esclerosis. Las etapas evolutivas de la enfermedad pueden verse al mismo tiempo en distintas zonas enfermas de un mismo sujeto (Del Pino et al. 2014).

1.5 Manifestaciones clínicas.

La enfermedad tiene una larga fase asintomática y hasta un 70% de los pacientes con EOP no refieren ningún tipo de sintomatología a lo largo de la evolución (Tiegs et al. 2000).

Las manifestaciones clínicas propias de la EOP son el dolor y la deformidad ósea, a las que se suman las provocadas por las complicaciones (Tan et al. 2014). Las localizaciones afectadas con más frecuencia son la pelvis (58-80%), la columna (40%), los fémures (32%), el cráneo (20-30%) y la tibia (16-20%). En segundo orden se encuentran las escápulas (5%), las clavículas (4%), las costillas (4%) y los huesos de la cara (Guma et al. 2002). En ocasiones se limita a un solo hueso (enfermedad monostótica), aunque con frecuencia suelen afectarse varios huesos no contiguos (enfermedad poliostótica) (Bolland et al. 2013). Durante la evolución no suelen aparecer lesiones distintas a las diagnosticadas inicialmente.

El dolor es, probablemente, el síntoma más frecuente. El dolor de origen óseo se describe como sordo, profundo, poco localizable, de predominio nocturno y que aumenta con la carga. Suele coincidir con un aumento de la actividad de la enfermedad. Se atribuye a la deformidad perióstica, al aumento de la vascularización y a las microfracturas. Mucho más frecuente es el dolor secundario a complicaciones, especialmente por atrapamiento neurológico o deformidades articulares (Vasireddy et al. 2003).

Las deformidades esqueléticas son más evidentes en los huesos largos, el cráneo y las clavículas. Los huesos largos se incurvan (incurvación anterior de la tibia y anterolateral del fémur) por el aumento del volumen y maleabilidad óseos (figuras 4 y 5). El crecimiento del tamaño y las deformidades craneales y faciales pueden transformar la fisonomía del paciente (Del Pino-Montes et al. 2009).

Fig.4. Deformidad clínica y radiológica del radio en paciente con EOP.

Fig.5. Tibia "en sable" en paciente con EOP.

El aumento de la vascularización ósea puede acompañarse de un incremento del calor local, más apreciable en los huesos superficiales como la tibia (Altman 1980).

1.6 Complicaciones.

Se han descrito diversas complicaciones: artropatía degenerativa, neurológicas, fracturas, alteraciones cardíacas, trastornos metabólicos y tumores óseos (Seton 2013).

1.6.1 Artropatía secundaria por vecindad.

Es causa de dolores mecánicos. Cuando la lesión asienta en la proximidad de una articulación modifica el hueso subcondral y altera la congruencia articular. La coxopatía y la artropatía de rodilla son las más frecuentes (Hadjipavlou et al. 1986).

1.6.2 Fracturas.

Son frecuentes las fracturas patológicas o traumáticas (figura 6), especialmente las fracturas femorales y tibiales (Melton et al. 2000).

1.6.3 Complicaciones neurológicas.

Se deben a una compresión directa de estructuras neurológicas o a insuficiencia vascular secundarias al crecimiento óseo y a fenómenos de robo vascular por la hipervascularización ósea, respectivamente (Bone 2006).

La sordera, de predominio neurosensorial, es muy frecuente cuando se afecta la base del cráneo (hueso temporal) (Monsell et al. 1995). Más raramente pueden encontrarse alteraciones visuales, neuralgia del trigémino o parálisis facial por la compresión de otros pares craneales (Eretto et al. 1984). Una complicación excepcional es la paraplejía y la hidrocefalia como consecuencia de una platibasia adquirida con invaginación de la apófisis odontoides en el agujero occipital (Douglas et al. 1981). El sistema nervioso

intrarraquídeo puede afectarse por compresión medular o radicular y por isquemia (McCloskey 2002).

1.6.4 Afectación bucodental.

La localización mandibular es causa de maloclusión e hipercementosis. La extracción dentaria puede ser muy dificultosa (Ralston 2013).

1.6.5 Complicaciones cardiovasculares.

Es rara la insuficiencia cardiaca congestiva de elevado gasto, que se atribuye a “robo” parcial del volumen sanguíneo circulante por aumento de la red vascular en las zonas afectas, que actuarían como fístulas. La cuarta parte de los pacientes tienen estenosis aórtica por calcificación valvular. También son frecuentes los bloqueos completos o incompletos del sistema de conducción (Ralston 2013).

1.6.6 Alteraciones del metabolismo del fósforo y del calcio.

La gran actividad metabólica ósea puede condicionar hipercalcemia e hipercalciuria en pacientes inmovilizados. La prevalencia de hiperparatiroidismo en la EOP es mayor que en la población general, y debe sospecharse en pacientes ambulatorios con hipercalcemia (Ralston 2013).

1.6.7 Tumores óseos.

La transformación tumoral del hueso pagético, especialmente a osteosarcoma, es una complicación rara que aparece en menos del 0,5 % de los pacientes. Tiene un mal pronóstico por la frecuente extensión local y desarrollo de metástasis pulmonares (Hansen et al. 2006).

1.7 Diagnóstico.

En la mayoría de los casos (75%) el diagnóstico de EOP es casual, sugerido por el hallazgo, en análisis que fueron realizados por motivos distintos al estudio del metabolismo óseo, de niveles elevados de fosfatasa alcalina (FA) en ausencia de patología hepática, o bien por la presencia de cambios

radiográficos sugerentes en radiografías practicadas por otros problemas médicos (Guma et al. 2002).

1.7.1 Marcadores de recambio óseo (MRO).

La elevación de los MRO reflejan las modificaciones del metabolismo óseo. La FA total y la isoenzima ósea de la FA (marcadores de la formación ósea), el fragmento aminoterminal del propéptido del colágeno I (PINP) y el telopéptido aminoterminal (marcadores de resorción ósea), se encuentran elevados en las fases de actividad metabólica de forma proporcional, lo que da idea del acoplamiento entre los procesos de formación y resorción. El resto de los parámetros metabólicos óseos son normales en los enfermos con EOP, salvo en pacientes inmovilizados con enfermedad extensa (la desaparición del estímulo de la carga desajusta el acoplamiento entre formación y resorción a favor de esta última), o coexistencia de hiperparatiroidismo primario. Debido a su amplia disponibilidad, su baja variabilidad y su bajo precio, la FA total es el mejor marcador de uso clínico para la EOP. El PINP es más específico y puede ser útil como prueba de segunda línea cuando la FA es normal o está levemente elevada, o cuando existe elevación de otras enzimas hepáticas y se sospecha EOP activa (Bolland et al. 2013; Selby et al. 2002).

1.7.2 Radiología simple.

La radiología simple suele ser la base del diagnóstico (figura 6 y 7), ya que sus características son fácilmente reconocibles (tabla 1). Las imágenes varían según la fase evolutiva y el tipo de hueso (tabla 2). Es difícil encontrar pacientes en la primera fase y lo habitual es hacerlo en fases más avanzadas. La lesión no suele afectar al hueso en toda su extensión y el límite entre las zonas sana y enferma aparece como una imagen lítica (“en forma de V” en la diáfisis de los huesos largos). La tomografía computadorizada y la resonancia magnética no suelen aportar más datos que la radiología simple, aunque pueden ser útiles en algunos pacientes con complicaciones como estenosis del canal medular o degeneración sarcomatosa (Del Pino et al. 2014).

Tabla.1. Imágenes características en la radiografía de la EOP.

- Engrosamiento del díploe e imágenes algodonosas en cráneo
- Vértebras en marco
- Engrosamiento trabecular de las vértebras
- Vértebras hiperdensas (vértebra de marfil)
- Engrosamiento de la línea iliopectínea (iliopubiana) en pelvis
- Engrosamiento rama isquiopubiana en pelvis
- Protusión acetabular
- Incurvaciones y fracturas en forma de fisuras corticales en huesos largos

Tabla.2. Evolución de la lesión radiológica en la EOP.

- Fase precoz: principalmente lítica
  - Imagen “V” invertida en huesos largos
  - “Osteoporosis circunscripta” en cráneo (frontal y/o occipital)
- Fase mixta: lesiones líticas y esclerosas
  - Engrosamiento cortical (formación subperióstica)
  - Pérdida de la diferenciación entre la cortical y la medular
  - Acentuación (engrosamiento o rarefacción) de las trabéculas
  - Osteolisis en diáfisis y esclerosis en metáfisis
  - Aumento del tamaño del hueso
- Fase tardía
  - Engrosamiento de huesos largos
  - Aumento del tamaño de los huesos (formación subperióstica)
  - Fracturas de estrés transversales en huesos largos
  - Esclerosis
    - Aumento de densidad uniforme
    - Áreal mixtas de esclerosis y radiotransparencia

Fig.6. Afectación de tibia en paciente con EOP.

Fig.7. Vértebra en marco en paciente con EOP.

1.7.3 Gammagrafía ósea.

La gammagrafía ósea con bisfosfonatos (BSF) marcados con tecnecio-99 ofrece imágenes de aumento de captación (3-5 veces la del hueso normal) en zonas de incremento de la vascularización y actividad osteoblástica (figura 8). Aunque poco específica, tiene una gran sensibilidad para detectar lesiones, incluso las muy precoces aún no visibles en la radiografía (Selby et al. 2002).

Fig.8. Gammagrafía ósea en paciente con EOP y afectación de fémur, pelvis y columna lumbar

1.7.4 Biopsia.

La biopsia ósea no suele ser necesaria para el diagnóstico, aunque puede ser útil para el diagnóstico diferencial con los tumores. Los hallazgos más característicos son la presencia de trabéculas anómalas, las líneas de cementación irregulares con la típica imagen “en mosaico”, el aumento de la vascularización y el incremento del número y tamaño de los osteoclastos (figura 9) (Seitz et al. 2009).

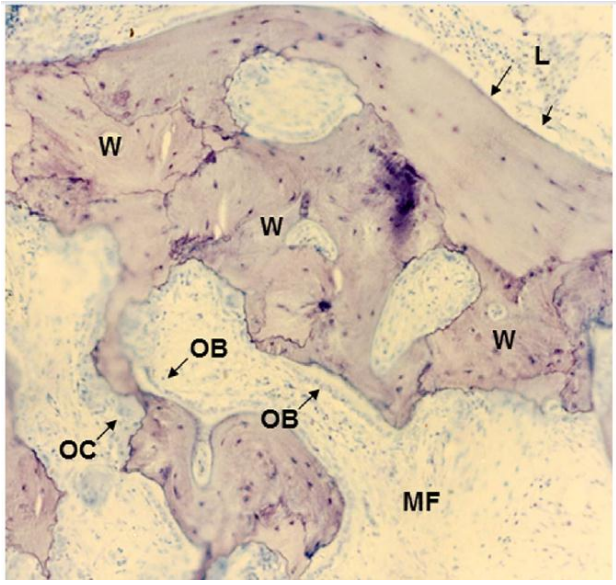

Fig.9. Biopsia ósea de paciente con EOP de larga evolución. OB: osteoblasto. OC: osteoclasto. W: hueso anómalo ("woven"9. L: hueso laminar normal. MF: fibrosis de médula ósea). Tomado de Vallet et al 2015.

1.8 Tratamiento.

Los objetivos terapéuticos son limitar la progresión y las complicaciones, así como controlar las manifestaciones clínicas.

1.8.1 Indicaciones.

Las guías de práctica clínica (Devogelaer et al. 2008; Ralston 2013; Siris et al. 2006; Takata et al. 2006; Lojo et al. 2012) coinciden en señalar como indicación absoluta el tratamiento de los pacientes sintomáticos, con dolor óseo primario y con enfermedad metabólicamente activa, insuficiencia cardiaca, fisuras corticales, las fracturas completas, la hipercalcemia, y como prevención del sangrado local en los pacientes que van a ser sometidos a cirugía del hueso afectado.

Algunos autores consideran indicado el tratamiento de pacientes en fase precoz para prevenir el desarrollo de la enfermedad, ya que los BSFs revierten las lesiones líticas y mejoran la histología ósea. Además, podrían limitar el desarrollo de deformidades óseas en huesos largos que soportan peso y en huesos faciales. Aunque no hay estudios que lo confirmen, en pacientes con

enfermedad activa podría prevenirse la aparición o la progresión de diversas complicaciones como la artropatía por lesiones en la vecindad articular, la sordera o la compresión neurológica (especialmente la intrarraquídea).

Se asume que en los pacientes más jóvenes, menores de 60 años, la progresión de la enfermedad puede desarrollar complicaciones a largo plazo, y el tratamiento podría evitar su aparición. En este sentido, algunas guías proponen iniciar tratamiento cuando la FA total supere el doble del nivel superior de la normalidad. Habitualmente se evalúa la actividad de la enfermedad mediante la FA sérica, aunque Renier y colaboradores afirman que esto no sería totalmente correcto (Renier et al. 1984), ya que, si no se tiene en cuenta la extensión de la enfermedad, se puede subestimar enormemente la actividad de la misma en las formas monostóticas.

En el horizonte terapéutico de cualquier enfermedad se postula la posibilidad de un tratamiento preventivo. En el caso de la EOP se ha propuesto si el tratamiento con BSFs en fases preclínicas podría eliminar los osteoclastos pagéticos y evitar el desarrollo de la enfermedad. Esto podría ser interesante especialmente en los sujetos con mayor riesgo, como son los hijos SQSTM1 positivos de padres con EOP. Está en desarrollo un ensayo clínico con ácido zoledrónico (ZOL), el estudio ZiPP (Zoledronate in the Prevention of Paget´s disease; ISRCTN11611770), cuyos resultados pueden aclararnos esta posibilidad.

1.8.2 Fármacos.

El tratamiento específico está dirigido a suprimir la actividad osteoclástica en las lesiones pagéticas.

Los BSFs tienen una acción antirresortiva intensa y prologada. Debe asociarse calcio (1.000-1.500 mg/día) y vitamina D (800 UI/día) para evitar la hipocalcemia y el déficit de vitamina D, que pueden conducir a trastornos de la mineralización. En la tabla 3 se muestran los BSFs usados en la EOP (Ralston 2013). El fármaco de primera elección es el ZOL, debido a su eficacia, comodidad y seguridad (Reid et al. 2005; Reid et al. 2011).

La calcitonina ha dejado de estar indicada porque sus escasos beneficios no compensan los riesgos de su utilización.

Se han comunicado buenos resultados en algunas experiencias aisladas con otro antirresortivo potente como denosumab, pero no está autorizado para esta indicación (Schwarz et al. 2012).

El tratamiento sintomático con analgésicos, anti-inflamatorios no esteroideos y fármacos coadyuvantes, se utiliza en los pacientes con escasa o moderada actividad. Además, la rehabilitación y las ayudas para la marcha, mejoran la calidad de vida del paciente.

Tabla.3. BSFs usados en el tratamiento de la EOP.

Vía de administración	Fármaco	Dosis	Efectos adversos
Vía oral	Etidronato*†	400mg/día durante 3-6 meses	Diarrea, naúseas, dolor abdominal
	Tiludronato†	400mg/día durante 3 meses	Diarrea, naúseas, dispepsia
	Risedronato†α	30mg/día durante 2 meses	Dispepsia, esofagitis
	Alendronato‡§	40mg/día durante 6 meses	Dispepsia, esofagitis
Vía intravenosa	Pamidronato†	30-60mg/día durante 3 días	Síndrome pseudo-gripal, hipocalcemia
	ZOL§β	5mg, infusión única	Síndrome pseudo-gripal, hipocalcemia

* Prácticamente no se utiliza

† Contraindicado si la tasa de filtración glomerular es menor de 30 ml/minuto por 1,73 m2 de superficie corporal total

α 60-70 % buena repuesta medida por MRO

‡ No tiene indicación en los países europeos

§ Contraindicado si la tasa de filtración glomerular es menor de 35 ml/minuto por 1,73

β 90 % normalización MRO

1.8.3 Cirugía.

En caso de fractura, deformidad o artropatía pagética, puede estar indicada la cirugía. En relación con las fracturas limitadas a la cortical, algunos

autores recomiendan la consolidación con un clavo, para así evitar la fractura completa (Parvizi et al. 2006).

1.8.4 Evaluación de la eficacia.

En los casos sintomáticos, el indicador de la eficacia terapéutica es el alivio de las manifestaciones clínicas. En el resto de los casos, se acepta por la mayoría de los autores la conveniencia de seguir la respuesta terapéutica a través de los MRO, siendo la FA total suficiente en la mayor parte de los casos. Aunque el ideal es su normalización, en los últimos ensayos clínicos se considera una buena respuesta terapéutica la disminución de al menos el 50-75 % de los valores previos al tratamiento (Vallet et al. 2015; Reid et al. 2011).

No se recomienda repetir el tratamiento antes de los 6 meses del tratamiento previo. La principal indicación es la reaparición de los síntomas. También es aconsejable cuando aparezca una nueva lesión radiológica lítica. Algunas guías proponen tratar nuevamente cuando se observe una reactivación con un aumento de la FA total por encima del 25 % del valor superior de la normalidad en pacientes que consiguieron la normalización, o del 25 % del valor alcanzado después del tratamiento en los que no llegaron a la normalización (Ralston et al. 2008).

2 Remodelado óseo y angiogénesis.

2.1 Fisiopatología del remodelado óseo.

El hueso es un tejido complejo compuesto de varios tipos de células que se someten a un proceso continuo de renovación y reparación denominado "remodelado óseo". Este recambio ocurre a la vez en distintas regiones del esqueleto, presentando distintos grados de actividad y desarrollo en cada una de ellas (Sims et al. 2014).

Los dos tipos principales de células responsables del remodelado óseo son los osteoclastos, que resorben el hueso, y los osteoblastos, que forman matriz ósea nueva (figura 10). Ambos procesos están interrelacionados ocurriendo de forma secuencial (Riancho et al. 2011).

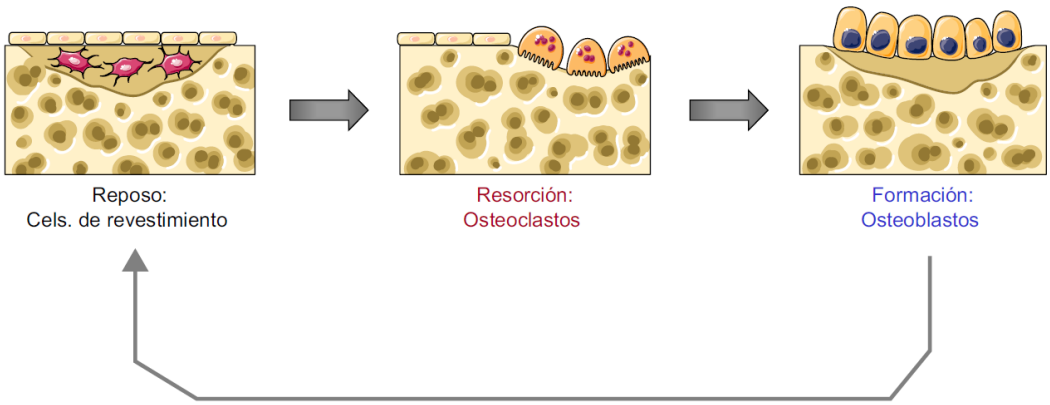

Fig.10. Esquema del remodelado óseo. Tomado de Riancho et al 2011.

Los osteoclastos son células de origen hematopoyético, que derivan de la fusión de precursores mononucleares de la estirpe gránulo monocítica (CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias Gránulo Monocíticas), que derivan a su vez de células madre hematopoyéticas (CMH). La diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos son reguladas en respuesta a la expresión coordinada de distintas moléculas reguladoras incluyendo la proteína c-Fos,

RANK, M-CSF, RANKL y OPG (figura 11). (Tanaka et al. 1993; Teitelbaum 2000).

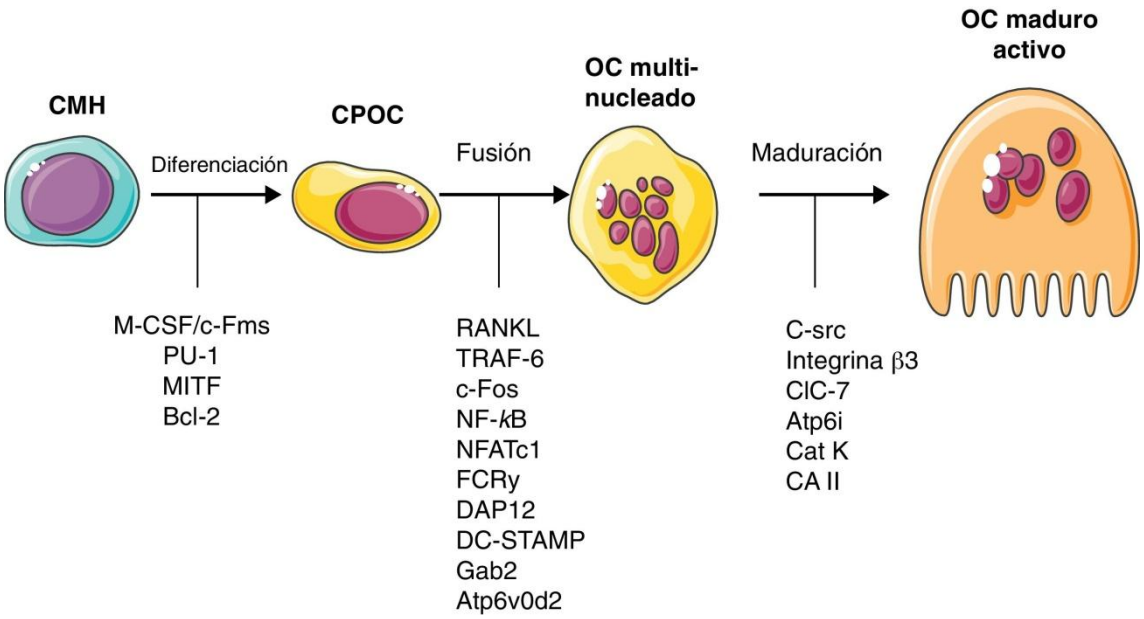

Fig.11. Proceso de diferenciación, fusión y maduración del osteoclasto. Tomado de Arboleya et al 2013.

Los osteoclastos son células macrofágicas, multinucleadas y altamente especializadas, capaces de hidrolizar la matriz del hueso, tanto la parte inorgánica (hidroxiapatita), como la orgánica (colágeno y otras proteínas). El mecanismo que da lugar a la activación local de los osteoclastos no es bien conocido. Se ha propuesto que, bien las células precursoras de los osteoclastos, bien otras células presentes en el tejido óseo (osteoblastos, osteocitos, células del sistema inmune), reconocerían un cambio en la superficie ósea por su envejecimiento y la necesidad de un recambio, lo cual daría lugar al envío de señales que activarían a los osteoclastos (Sims et al. 2008).

RANK es expresado en los osteoclastos y sus precursores. Es miembro de la superfamilia de receptores de TNF. RANKL es producido por los osteocitos, células T activadas, osteoblastos y células estromales de la médula ósea hematopoyética. La unión RANKL-RANK promueve la diferenciación de

osteoclastos y favorece su supervivencia mediante la activación de la vía del NFκB (Theill et al. 2002).

OPG, un tercer miembro de la familia de los receptores de TNF, también interviene en el desarrollo de los osteoclastos. OPG es un receptor proteico soluble que compite con RANK, actuando como un receptor señuelo en su unión con RANKL. La relación entre los niveles de OPG y RANKL es crítica para la regulación la actividad de los osteoclastos, controlando la activación de RANK en los osteoclastos. Tanto RANKL como OPG son secretados por osteoblastos, osteocitos y células estromales, y sus niveles están regulados por múltiples factores sistémicos y locales (figura 12) (Hofbauer et al., 2000).

Otros factores locales bien conocidos que regulan la osteoclastogénesis y la activación de los osteoclastos son IL-1, IL-6, IL-4, IL-18, interferón (IFN) β, IFNα, TNF y factor transformante β (TGFβ), entre otros. Además, existen distintos factores sistémicos que regulan la osteoclastogénesis y la activación de los osteoclastos como la hormona paratiroidea (PTH), la vitamina D, la calcitonina, los estrógenos y andrógenos, los glucocorticoides, y las hormonas tiroideas (figura 12) (Datta et al. 2008).

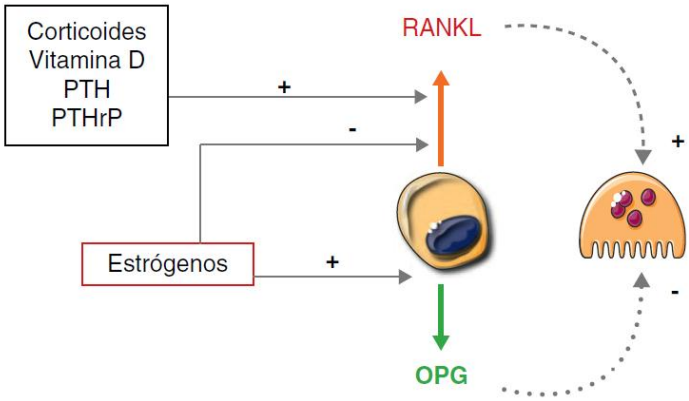

Fig.12. Efectos de los factores hormonales sobre RANKL y OPG. Tomado de Riancho et al 2011.

Los osteoblastos, por otro lado, son células de origen mesenquimal, que se diferencian a partir de células estromales de la médula ósea en respuesta a la activación del factor de transcripción CBFA1 (figura 13) (Harada et al. 2003).

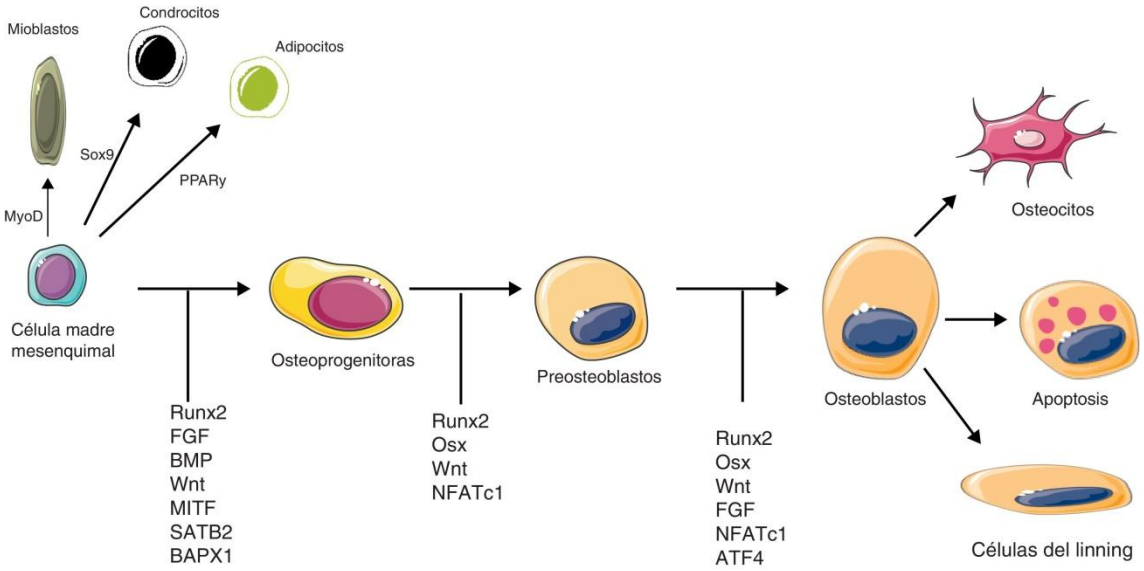

Fig.13. Proceso de diferenciación de los osteoblastos. Tomado de Arboleya et al 2013.

Durante el ciclo de remodelado óseo, el hueso viejo o dañado es eliminado por los osteoclastos, que secretan ácidos y enzimas proteolíticas, como la catepsina k, en la superficie del hueso. Posteriormente, los osteoclastos migran fuera de la zona del hueso que ha sido sometido a la resorción y se eliminan por apoptosis. Ellos son reemplazados por los osteoblastos, que establecen nueva matriz ósea en forma de matriz osteoide no mineralizada. Más tarde, el osteoide se calcifica para formar hueso maduro. Durante la formación de hueso, algunos osteoblastos quedan incrustados dentro de la matriz ósea y se diferencian a osteocitos. Los osteocitos están interconectados entre sí y con las células sobre las superficies del hueso a través de una serie de largos procesos citoplasmáticos. Se cree que los osteocitos actúan como sensores de tensión mecánica en el esqueleto, respondiendo a estos cambios (Sims et al. 2014).

La hipótesis actual apoya el papel de los osteocitos en el control del remodelado óseo a través de la esclerostina (SOST) y OPG de origen

osteocítico. Además, la apoptosis de los osteocitos en una determinada región ósea se acompañaría de un aumento de RANKL y la consiguiente activación de la osteoclastogénesis (figura 14) (Bonewald 2011; Kogianni et al. 2007).

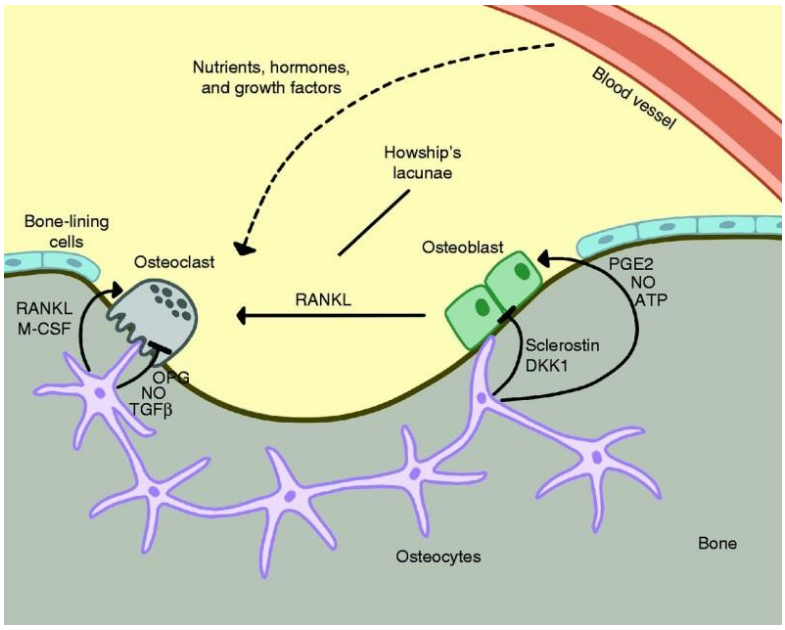

Fig.14. Interacción entre osteocitos, osteoclastos y osteoblastos durante el remodelado óseo. Tomado de Niedzwiedzki et al 2015.

El remodelado óseo está regulado por varias hormonas sistémicas, como ya se ha comentado, sin embargo, el que exista una cronología diferente dentro de un mismo sistema permite suponer que la secuencia de eventos celulares que conforma el proceso de remodelado está controlada principalmente por los factores locales que forma el microambiente óseo, como óxido nítrico (NO), prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas (Sims et al. 2014).

2.2 Acoplamiento entre la angiogénesis y el metabolismo óseo.

Los vasos sanguíneos y las células óseas deben estar firmemente acoplados para asegurar una estrecha proximidad física durante los cambios fisiológicos en el remodelado óseo y durante la reparación del hueso después de una lesión o de un tratamiento quirúrgico (Carano et al. 2003).

La morfogénesis vascular es un elemento esencial en el proceso de modelado necesario para el desarrollo de los huesos y la reparación del esqueleto post-natal, con los vasos sanguíneos sirviendo como plantilla estructural en torno al cual se lleva a cabo el desarrollo del hueso. La vascularización no sólo es esencial para el aporte de oxígeno y nutrientes al hueso, sino que también juega un papel vital en la comunicación entre células madre óseas, progenitores osteogénicos, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (Brandi et al. 2006; Gerber et al. 1999).

Los huesos planos se desarrollan por osificación intramembranosa, mientras que los huesos largos lo hacen por osificación endocondral. La osificación intramembranosa resulta de la diferenciación de los precursores mesenquimales en osteoblastos, mientras que la osificación endocondral comienza durante la embriogénesis cuando las células mesenquimales se diferencian en condrocitos (Mackie et al. 2008).

Así, el hueso cortical es modelado alrededor del sistema Haversiano, con un vaso sanguíneo sirviendo de eje, mientras que el hueso trabecular es modelado alrededor de las estructuras vasculares que se infiltran en las columnas vacías que quedan después de la apoptosis de los condrocitos durante la formación endocondral del hueso. En el hueso adulto, el espacio medular está dispuesto alrededor de los sinusoides vasculares, que sirven como un nicho en el que las células madre osteogénicas y hematopoyéticas residen como una unidad básica asociada a la remodelación ósea (figuras 15 y 16) (Sacchetti et al. 2007).

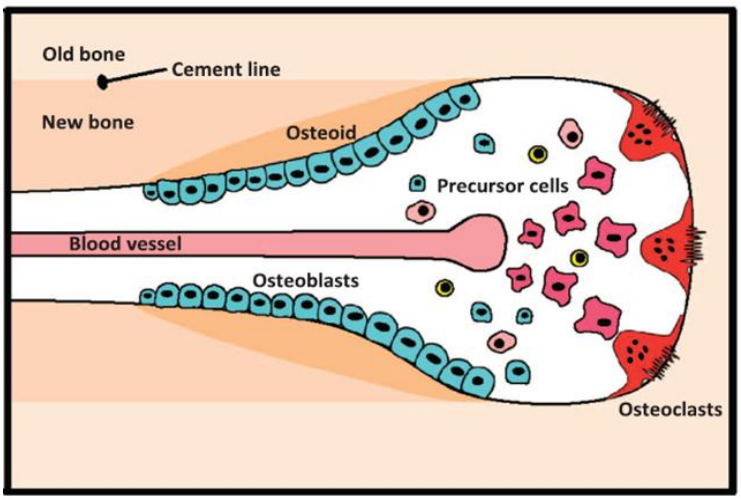

Fig.15. Esquema de la unidad de remodelado en el hueso cortical. Tomado de Sims et al 2014.

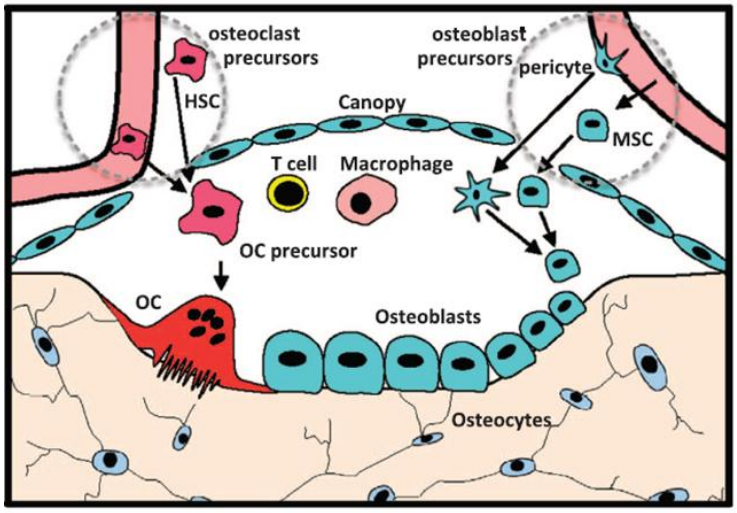

Fig.16. Esquema de la unidad de remodelado en el hueso trabecular. Tomado de Sims et al 2014.

Estas observaciones sugieren una codependencia recíproca entre los tejidos vascular y esquelético, en el que cada tejido proporciona señales morfogenéticas o señales ambientales que son cruciales para el desarrollo del otro. Además, estudios recientes han mostrado que la morfogénesis vascular y

esquelética son interdependientes unos de otros (Dilling et al. 2010; Eshkar-Oren et al. 2009).

En estudios de desarrollo, se encontraron precursores osteogénicos asociados íntimamente con la invasión de los vasos sanguíneos ("pericyte-like") durante la formación endocondral del hueso embriológico y en la curación del hueso tras fracturas, identificando la participación específica de los precursores de osteoblastos en el acoplamiento vascular y osteogénico, fundamental para el desarrollo del hueso endocondral y la reparación, destacando la importancia de los factores derivados de los osteoblastos en el acoplamiento de las actividades de formación de hueso con la vascularización (Maes et al. 2010).

En humanos, la curación de fracturas se ve comprometida en gran medida en situaciones de mala cobertura muscular o en daños a la musculatura debido a un trauma del lecho vascular del músculo. En estudios experimentales, el desarrollo de isquemia del miembro inferior conduce a un retraso en la curación de fracturas, mientras que la insuficiencia vascular asociada al envejecimiento de los animales se ha asociado con una reparación disminuida de fracturas (Lu et al. 2007; Lu et al. 2008).

En relación con el proceso de remodelado óseo, predominante en el hueso maduro, a diferencia del modelado óseo, se inicia con la activación de los osteoclastos. En este sentido, se ha demostrado la importancia del endotelio en la ontogenia y el reclutamiento de osteoclastos in vitro, ya que la adhesión de precursores de osteoclastos a las células endoteliales induce su diferenciación en elementos más maduros y su agrupación para formar grandes células multinucleadas (Formigli et al. 1995).

Por otro lado, las deficiencias en el suministro vascular o una vascularización ósea inadecuada se han relacionado con una disminución de la formación ósea y la masa ósea. Así, se han descrito cambios significativos en el hueso trabecular, la hematopoyesis, y vasos de la médula ósea en la osteoporosis primaria y el envejecimiento, poniendo de relieve el posible papel de un defecto de la microvasculatura en la patogénesis de la osteoporosis (Burkhardt et al. 1987).

Sin embargo, a pesar de la dependencia de una vascularización adecuada, todavía no se ha definido si el control primario de la angiogénesis en el hueso es intrínseca a los osteoblastos, osteoclastos o a poblaciones de células endoteliales y, aunque la vascularización precede temporalmente a la formación de hueso, sería posible que la angiogénesis del hueso fuera impulsada en primera instancia por factores liberados por osteoblastos, osteoclastos u osteocitos (figuras 17 y 18) (Chim et al. 2013).

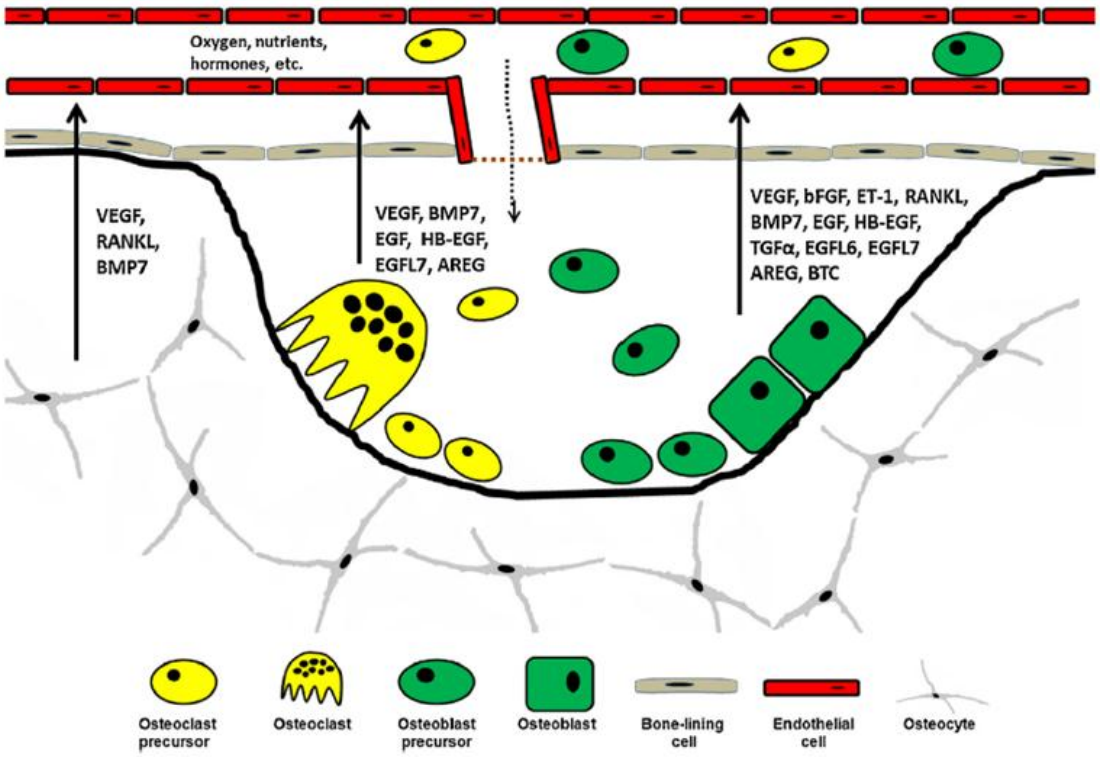

Fig.17. Factores angiogénicos producidos en la unidad de remodelado óseo. Tomado de Chim et al 2013.

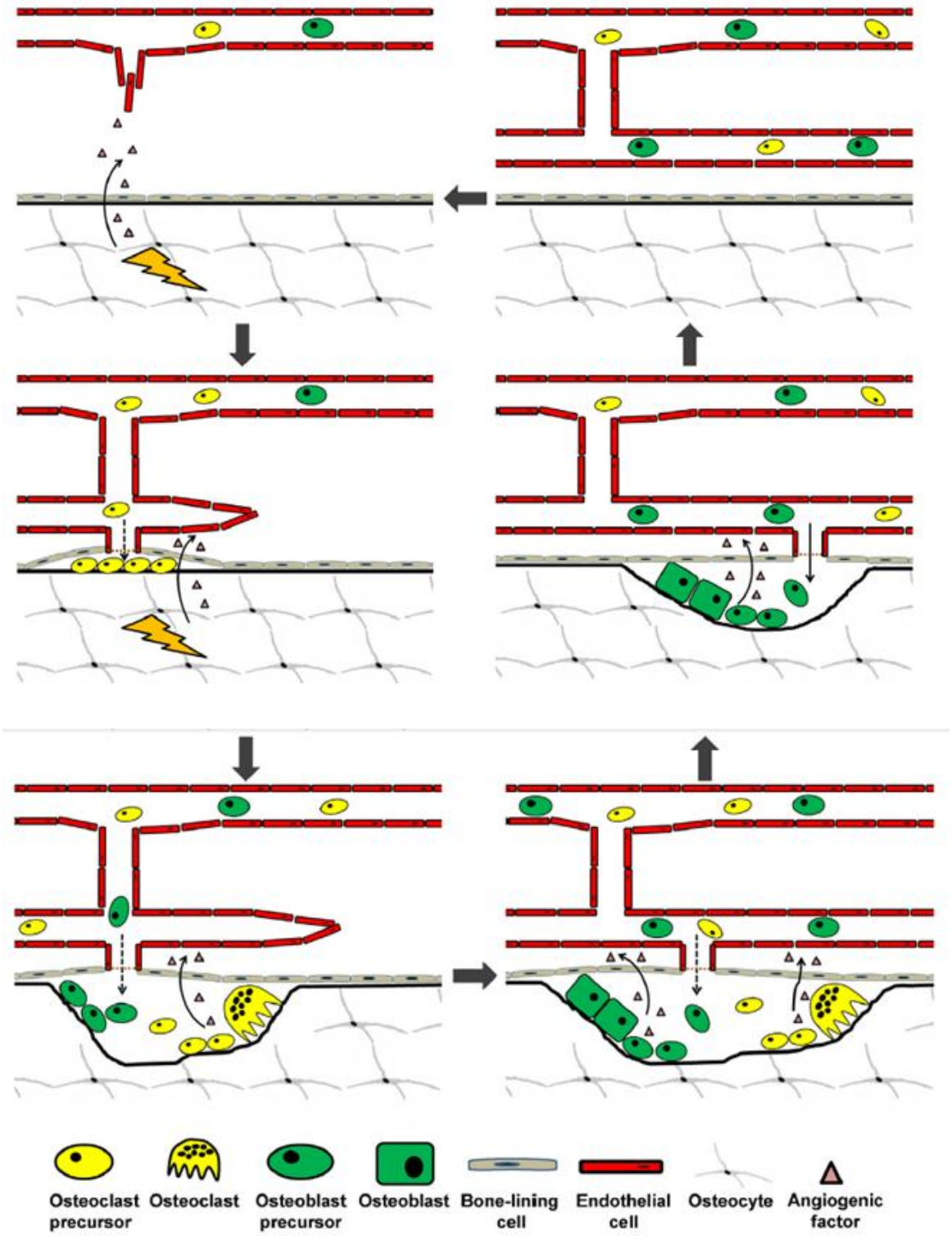

Fig.18. Modelo hipotético que muestra la regulación de la angiogénesis por osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Tomado de Chim et al 2013.

3 Principales reguladores de la angiogénesis.

3.1 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptor de VEGF (VEGFR).

VEGF es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante el desarrollo embrionario, el crecimiento postnatal y la homeostasis. VEGF potencia la proliferación, migración y supervivencia de células endoteliales (CE) y promueve la permeabilidad vascular (Ferrara et al. 2003).

Aunque las CEs son el objetivo principal de VEGF, se piensa que generalmente no expresan VEGF y que, en lugar de ello, responden al VEGF secretado de forma paracrina (Couffinhal et al. 1997). Además, se especula que la expresión en la CE tanto del receptor como del ligando podría llevar a una retroalimentación positiva peligrosa, causando sobreproliferación, como se observa en hemangiomas (Hamlat et al. 2005) y en la génesis tumoral (Tang et al. 2004). Sin embargo, se ha demostrado que las CEs pueden expresar VEGF bajo condiciones hipóxicas (Namiki et al. 1995), por lo que parece que las CEs podrían ser sensibles a su propia producción de VEGF, significando que las señales mediadas por VEGF autocrino también podrían ser importantes para el mantenimiento de la homeostasis vascular (Lee et al. 2007). Algunos investigadores postulan que solo las CEs de las arterias pueden segregar VEGF en ciertas condiciones (dela Paz et al. 2009; Maharaj et al. 2006).

La expresión continuada de VEGF y la activación constitutiva de VEGFR en prácticamente todos los tejidos adultos apoyan el concepto de que VEGF es esencial para la integridad y/o el mantenimiento de la vasculatura adulta, jugando además un papel importante en una variedad de patologías (Maharaj et al. 2007).

El miembro más estudiado de la familia, VEGFA, es uno de los principales promotores de la angiogénesis tanto fisiológica como patológica, y pertenece a una familia de proteínas homodiméricas que consta de seis

miembros: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE y el factor de crecimiento placentario (PGF) (Cross et al. 2003; Ferrara et al. 2003).

El gen de VEGFA humano está localizado en el cromosoma 6 y consta de ocho exones y siete intrones. Procesamientos alternativos producen transcripciones de mRNA que codifican al menos seis isoformas de la proteína de 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos de longitud. Estas isoformas varían en su afinidad para la unión con heparina y en su afinidad con la matriz extracelular (ECM). Las isoformas de mayor tamaño, como VEGF-206 y VEGF-189, se unen a la heparina con gran afinidad y son, además, retenidas en su práctica totalidad en la ECM. La isoforma de menor tamaño, VEGF-121, no se une a la heparina y se difunde libremente. Debido a que el dominio de unión a la heparina parece ser fundamental para la actividad mitótica, se piensa que la isoforma VEGF-165 representa la mejor unión entre disponibilidad y potencia biológica (Ferrara 2004; Neufeld et al. 1999).

VEGF se une a tres receptores de tirosin-kinasa muy relacionados entre sí: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. VEGFR1 fue el primer receptor en ser identificado, pero su función no está del todo aclarada todavía (de Vries et al. 1992). Es el de mayor afinidad de los tres. Se cree que su función principal consiste en actuar durante el desarrollo embrionario como un reclamo para retener VEGF, y así evitar la activación de VEGFR2 (Ferrara 2004). En adultos, VEGFR3 sólo es expresado por las CEs linfáticas y parece jugar un papel importante en la lifangiogénesis (Kaipainen et al. 1995). La unión del ligando VEGF con VEGFR2 produce la dimerización y autofosforilación del receptor, seguida de la fosforilación de numerosas proteínas relacionadas con la transducción de señales celulares que promueven diferentes procesos tales como la migración celular, la proliferación y la angiogénesis (figuras 19 y 20) (Ferrara 2004). Los tres receptores son necesarios para el correcto desarrollo de los mamíferos.

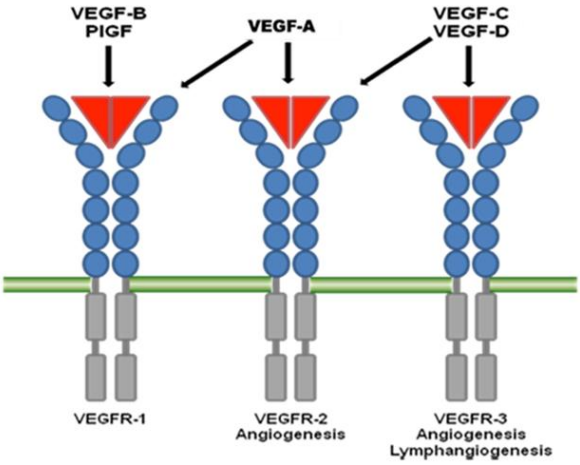

Fig.19. Esquema de los 3 receptores de VEGF. Adaptado de Hicklin et al 2005.

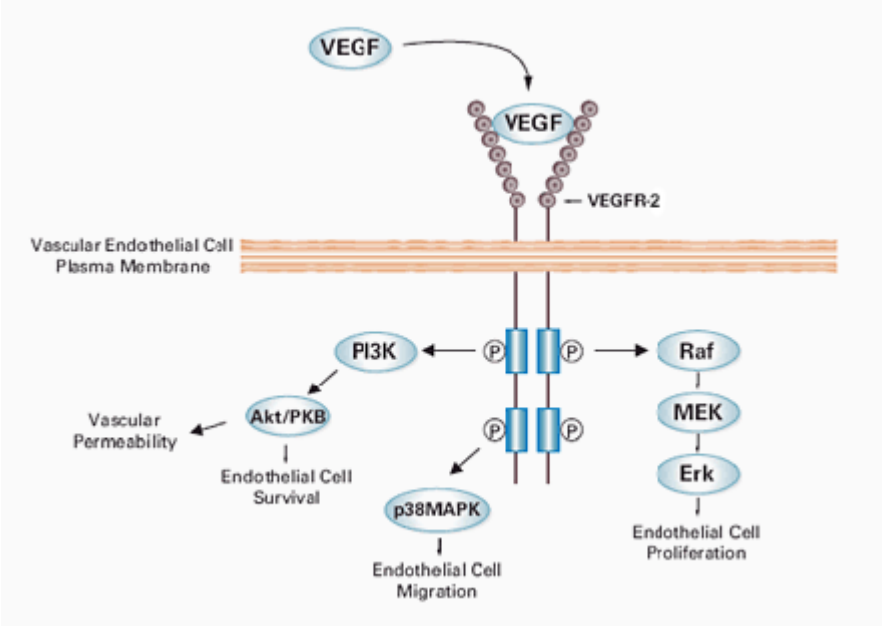

Fig.20. Acciones de VEGF sobre la célula endotelial. Tomado de Hicklin et al 2005.

VEGF, en particular VEGF-A, se produce por la mayoría de las células parenquimatosas, y actúa de una manera paracrina sobre las CEs adyacentes para regular la señalización de VEGFR. Sin embargo, la evidencia emergente demuestra que también actúa de una manera autocrina en una amplia gama de sistemas, expresando varios tipos de células VEGFR (D'Amore 2007). De

forma similar, algunas líneas de células tumorales expresan VEGFR (Wu et al. 2003).

3.1.1 VEGF, VEGFR y hueso.

Aunque, considerado como un mitógeno específico de las CEs, las acciones de VEGF en el hueso adulto parecen complejas.

VEGF juega un papel crítico en el desarrollo óseo (Gerber et al. 1999; Zelzer et al. 2005). Aunque se conoce poco acerca de su relevancia en el hueso adulto, existen algunas evidencias acerca de su importancia en enfermedades del remodelado óseo como la osteoporosis, o en el proceso de reparación ósea. Un estudio reciente demostró un suministro reducido de sangre local y una reducción de la expresión local de VEGF en la metáfisis tibial de ratones con osteoporosis inducida por ovariectomía (Ding et al. 2011). También se ha informado de que mujeres posmenopáusicas con polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados con alta o baja producción de VEGF tienen una mayor o menor densidad mineral ósea (DMO) de la columna lumbar, respectivamente (Costa et al. 2009). En cuanto a reparación ósea, varios estudios han demostrado que las alteraciones en la señalización de VEGF se asocian con deficiencias en la formación de hueso nuevo (Peng et al. 2005; Street et al. 2002).

Por último, el que existan vasos específicos dentro de los sistemas de Havers del hueso adulto capaces de expresar VEGF y contribuir a los niveles globales de VEGF en el microambiente de la médula ósea se desconoce actualmente, pero podría ser una posibilidad (Clarkin et al. 2013).

3.1.2 VEGF, VEGFR y osteoblastos.

Muchos de los miembros de la familia VEGF han sido identificados como reguladores de los osteoblastos, encontrándose presentes sus receptores en la superficie de estas células (D'Amore 2007). VEGF induce la diferenciación de osteoblastos cultivados y estimula la migración quimiotáctica y la proliferación de osteoblastos humanos (Deckers et al. 2000; Mayr-Wohlfart et al. 2002; Midy

et al. 1994), sugiriéndose que VEGF puediera regular la formación de hueso a través de un efecto sobre los osteoblastos.

Por otro lado, estudios de cultivo celular in vitro sugieren que VEGFR2 juega un papel importante tanto en la diferenciación como en la supervivencia de los osteoblastos (Alonso et al. 2008).

Junto con los condrocitos (Gerber et al. 1999), las células del linaje de los osteoblastos son consideradas como una importante fuente de VEGF (Wang et al. 1996). Además, es probable que los osteocitos también contribuyan a los niveles de VEGF en el hueso, ya que las células MLO-Y4, similares a osteocitos, expresan VEGFR y liberan VEGF en respuesta a ciertos estímulos mecánicos (Cheung et al. 2011).

Existe una amplia gama de estímulos capaces de modular la producción de VEGF por parte de los osteoblastos, incluyendo factores hormonales, mecánicos y ambientales, sugiriendo un papel central del osteoblasto en el control de la angiogénesis mediada por VEGF en el hueso, al constituir, probablemente, la fuente predominante de VEGF en el microambiente de la médula ósea (Clarkin 2013).

La hipoxia es uno de los inductores más potentes de la producción de VEGF en el hueso. Ésta puede producir un incremento de expresión de VEGFA por parte de los osteoblastos, los cuales expresan los componentes de la vía del factor inducible por hipoxia (HIF-1) (Steinbrech et al. 2000). La sobreexpresión de HIF-1α en osteoblastos maduros aumenta tanto la angiogénesis como la osteogénesis, y estos procesos parecen estar acoplados por un mecanismo que implica la acción del VEGF generado por los propios osteoblastos (figura 21) (Wan et al. 2008; Wang et al. 2007).

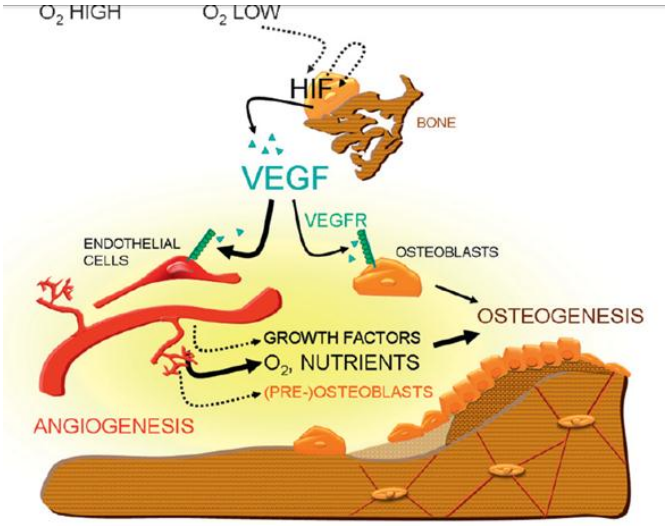

Fig.21. Regulación del acoplamiento entre la angiogénesis y la osteogénesis mediada por HIF y VEGF. Tomado de Schipani et al 2009.

Los cambios en el entorno mecánico juegan también un papel importante en la formación de hueso, al estimular la actividad osteogénica, así como la producción de VEGFA y de otros factores pro-angiogénicos por parte de los osteoblastos (Jaasma et al. 2007; Rubin et al. 2001; Schriefer et al. 2005).

Los estrógenos también parecen ser reguladores clave de la producción de VEGF por los osteoblastos (Pufe et al. 2007).

Por otra parte, la influencia pro-osteogénica de la PTH parece estar mediada, en parte, a través de un mecanismo relacionado con VEGF (Prisby et al. 2011) .

Una amplia gama de estímulos anabólicos también aumentan la expresión de VEGF y su liberación por los osteoblastos, incluyendo la prostaglandina E1 y E2 (Harada et al. 1994), el factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF) (Goad et al. 1996), 1,25-dihidroxivitamina D (Schlaeppi et al. 1997), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) (Saadeh et al. 2000), TGFβ (Zelzer et al. 2005), proteínas morfogénicas óseas (BMP) 2 , 4 , 6 y 7 (Deckers et al. 2000), y proteínas osteogénicas (figura 22) (Yeh and Lee 1999).

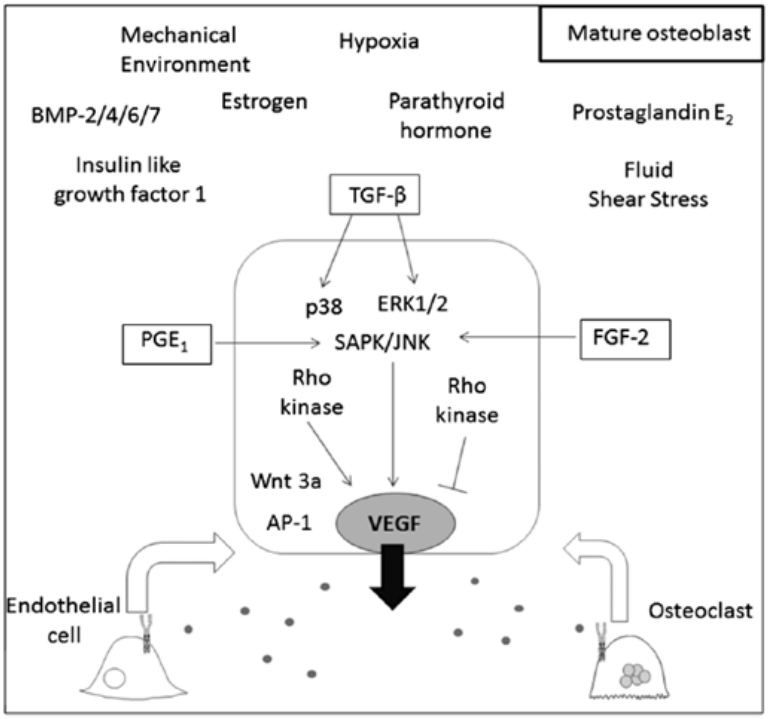

Fig.22. Factores que estimulan la formación de VEGF por parte del osteoblasto maduro y su relación con CEs y osteoclastos. Tomado de Clarkin et al 2013.

Los osteoblastos, además de ser regulados por VEGF, también son capaces de regular la función de otras células y de sí mismos por el VEGF que ellos liberan. La evidencia hasta la fecha sugiere una regulación autocrina de VEGF por parte de los osteoblastos (figura 23), y una señalización paracrina a otros tipos de células tales como las CE u osteoclastos (Clarkin et al. 2013; Liu et al. 2014). Sobre las CEs, VEGF estimula la expresión de factores de crecimiento y citoquinas, e inicia el proceso de angiogénesis que reclutará nuevos pre-osteoblastos a través de los vasos sanguíneos (Yang et al. 2012).

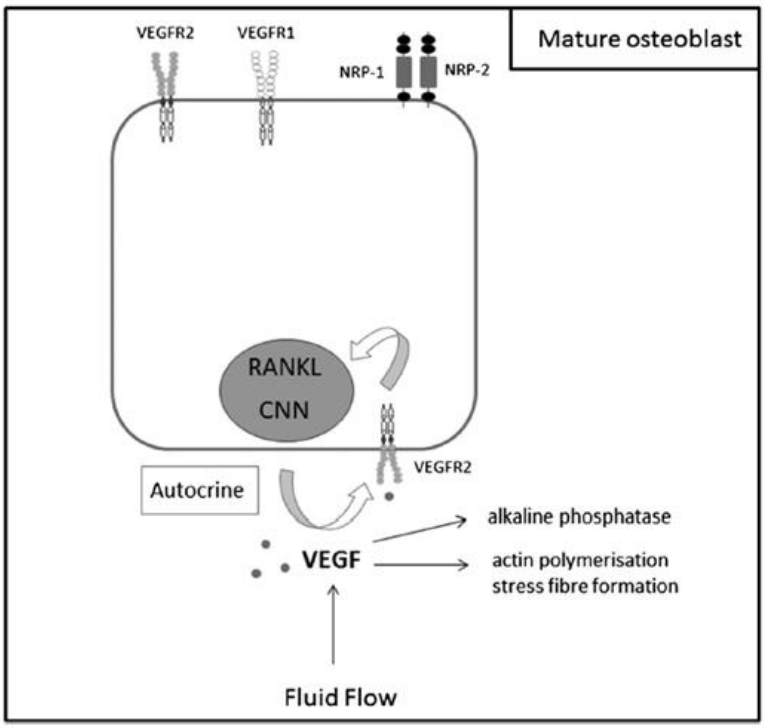

Fig.23. Regulación autocrina de VEGF en los osteoblastos. Tomado de Clarkin et al 2013.

Existe también evidencia de que el VEGF producido por células de linaje osteoblástico, por un mecanismo intracelular en lugar de por señalización paracrina, ayuda a mantener la homeostasis ósea mediante la promoción de la diferenciación de osteoblastos y la inhibición de la diferenciación de adipocitos óseos, ya que ambos tipos celulares provienen de la misma célula madre mesenquimal o estromal (CMM) (figura 24) (Liu el al. 2012). .

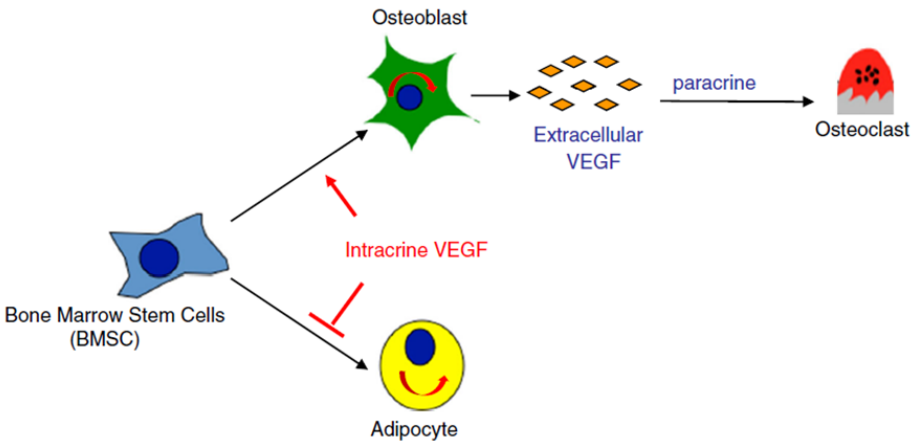

Fig.24. Diferenciación de MSC a osteoblasto por VEGF. Tomado de Liu et al 2014.

En relación con lo anterior, se ha demostrado como los ratones con deficiencia de VEGF en las células progenitoras osteoblásticas exhiben una reducción progresiva de la masa ósea y un aumento de la grasa de la médula ósea; curiosamente, estos cambios son similares a los cambios que están asociados con la osteoporosis dependiente de la edad (Liu et al. 2012).

No obstante, debe tenerse en cuenta que existen evidencias contradictorias, porque los datos principales proceden de estudios “in vitro” e “in vivo”, en variadas situaciones experimentales, células osteoblásticas de distintas especies y con el uso de diferentes métodos para detectar la expresión de VEGF. Por tanto, son necesarios nuevos datos para conocer cuál es su principal papel en la osteogénesis.

3.1.3 VEGF y osteoclastos.

Los osteoclastos están implicados en procesos más complejos que la resorción del hueso, y pueden ser activados para secretar factores que actúan a través de mecanismos autocrinos y paracrinos para contribuir a otros procesos tales como la angiogénesis. De hecho, físicamente los osteoclastos y los vasos sanguíneos están estrechamente asociados en cada compartimento de remodelado óseo.

Existe evidencia sobre el papel directo de VEGF sobre los osteoclastos a través de VEGFR2, provocando un aumento de la osteoclastogénesis, de la supervivencia del osteoclasto y de la actividad de resorción (Clarkin et al. 2013; D'Amore 2007; Liu et al. 2014).

Experimentos en cultivo celular óseo demostraron que VEGF puede sustituir a M-CSF y cooperar con RANKL para favorecer la osteoclastogénesis (Niida et al. 1999). Además, VEGF puede mejorar directamente la resorción ósea osteoclástica y la supervivencia de los osteoclastos maduros a través de VEGFR2 (Nakagawa et al. 2000; Yang et al. 2008).

También es interesante observar que las condiciones de hipoxia ejercen una influencia positiva sobre la función de los osteoclastos y la resorción de hueso. Además, en los osteoclastos, RANKL es capaz de regular a través NF-

kB la expresión de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de HIF1 en condiciones de normoxia y, por consiguiente, la expresión del gen diana de HIF-1, que es VEGFA (Trebec-Reynolds et al. 2010).

Se ha sugerido, al igual que ocurre en los osteoblastos, una potencial regulación autocrina de VEGF en los osteoclastos al observar que, ante condiciones de hipoxia, la expresión de VEGF por parte de los osteoclastos depende de su tamaño. (Trebec-Reynolds et al. 2010).

Pero, además del VEGF producido por los osteoclastos, la liberación de VEGF unido a la ECM también contribuiría a regular la función de otras células, estimulando, por ejemplo, la diferenciación de los osteoblastos y la angiogénesis de una manera directa (figura 25) (Cackowski et al. 2010). También puede hacerlo de forma indirecta ya que, en las CEs humanas, VEGF puede aumentar significativamente tanto la expresión de RNAm como de proteína de superficie de RANK, lo que aumenta la sensibilidad de las CEs a RANKL y promueve la angiogénesis. Además, ésto podría mejorar indirectamente la adhesión de precursores mononucleares de osteoclastos a las CEs (Min et al. 2003).

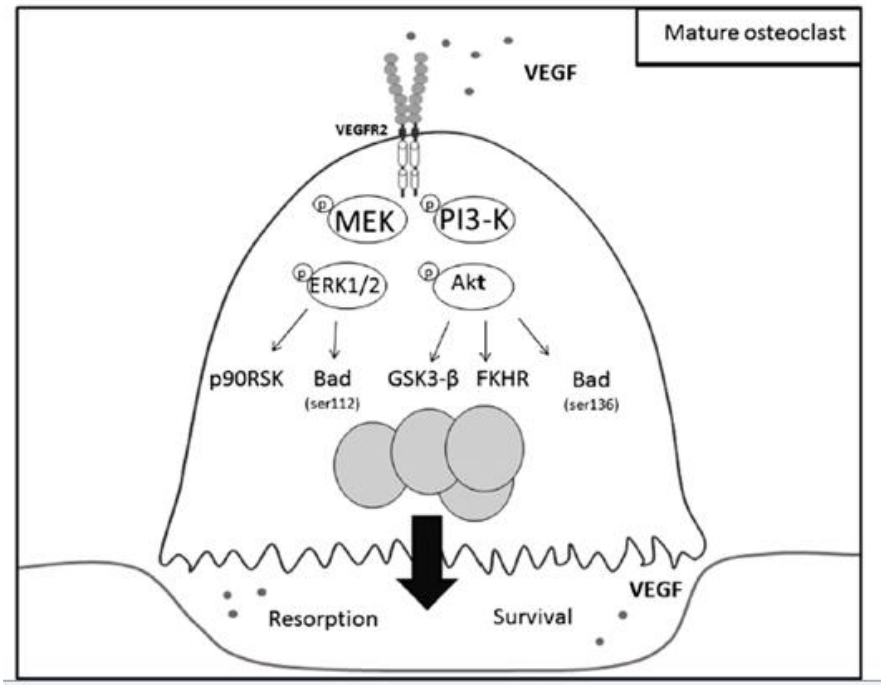

Fig.25. Efectos de VEGF sobre el osteoclasto y liberación de VEGF de la ECM por la resorción ósea. Tomado de Clarkin et al 2013.

3.1.4 VEGF, VEGFR y EOP.

Hasta la fecha, no se han publicado estudios en los que se estudien estas moléculas en la EOP. No obstante, es posible que juegue un papel en el desarrollo de la lesión ósea, ya que ésta tiene una gran vascularización.

3.2 Endotelina (ET).

Las ETs son una familia de péptidos con propiedades vasoactivas, compuesta por ET1, ET2 y ET3, codificadas por tres genes distintos y que presentan gran similitud molecular (Inoue et al. 1989).

Las ETs están distribuidas en una gran variedad de células y tejidos, presentando diferentes niveles de expresión y actuando como moduladores del tono vasomotor, la proliferación celular y la producción hormonal (Giannessi et al. 2001; Randall et al. 1989). ET1 es la isoforma predominante y la más estudiada de la familia. Son bien conocidas sus diversas acciones a nivel del músculo de la pared vascular, entre las que destacan su acción vasoconstrictora y proliferativa sobre las células de músculo liso que promueve la producción de fibroblastos (figura 26) (Kawanabe et al. 2011).

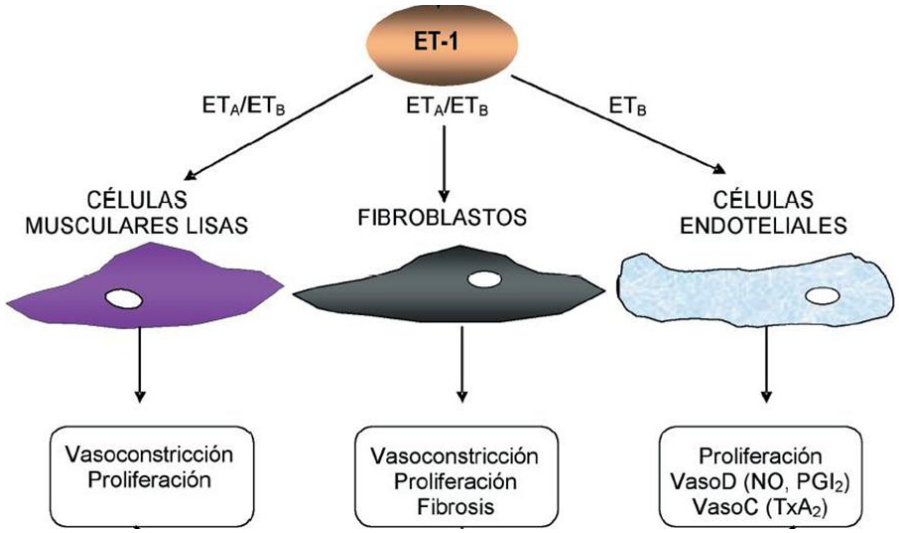

Fig.26. Efectos de ET1 en la pared vascular. Adaptado de Dupuis et al 2008.

ET1 es sintetizada principalmente por CEs (Yanagisawa et al. 1988) y, en menor medida, también por células del músculo liso vascular, presentando en ambas localizaciones una excreción paracrina. Otras localizaciones de síntesis son las células epiteliales, las células mesangiales, las células de la glía neuronal y células del hígado (Emori et al. 1991). ET2 es producida primariamente en el riñón y en el intestino, y también se sintetiza por la placenta, el útero y el miocardio (Fukunaga et al. 1991; Thomas et al. 1996). ET3 se produce en cerebro, vías digestivas y, en menor proporción, en pulmones y riñón (Kedzierski et al. 2001).

3.2.1 Endotelina 1 y hueso.

La abundancia de ET1 que producen las CEs de la médula ósea y la proximidad de estas células a los osteoclastos y osteoblastos sugieren un papel de la ET-1 sobre el metabolismo óseo.

Hasta la fecha, los experimentos realizados in vivo apoyan la noción de que la ET1 promueve la formación de hueso (Nelson et al. 1999; Tsukahara et al. 1998; Yin et al. 2003).

3.2.2 Endotelina 1 y osteoblastos.

Se ha demostrado que existen los dos tipos de receptores de ET, los receptores A y B, en los osteoblastos (Semler et al. 1995; Takuwa et al. 1990). ET1 ejerce sus potentes efectos estimulantes sobre la proliferación celular osteoblástica principalmente a través del receptor ET-A (Kasperk et al. 1997) y provoca aumento de proliferación, supervivencia y diferenciación de los osteoblastos (Clines et al. 2011; von Schroeder et al. 2003). Además, el que ET1 estimule la expresión de BMP en los osteoblastos es otra de las posibilidades sugeridas para explicar la formación de hueso in vivo mediada por ET1 (Kitten et al. 2001). Por otro lado, se ha sugerido que los propios osteoblastos podrían producir ET1 (Lam et al. 2000).

Con respecto al papel que juega ET1 sobre la producción de VEGF por parte de los osteoblastos, existen contradicciones entre las distintas observaciones realizadas hasta el momento. Las diferencias metodológicas de

los estudios “in vitro” hacen difícil establecer cuál es la relación entre ambas moléculas. Además, cabe la posibilidad de que los diferentes efectos de ET1 sean fisiológicamente relevantes en función de la etapa de maduración de los osteoblastos (Veillette et al. 2004). En alguno de estos estudios se ha observado que los osteoblastos que han sido estimulados con ET1 secretan VEGF, que a su vez estimula la proliferación de las CEs (Kozawa et al. 2000).

3.2.3 Endotelina 1 y osteoclastos.

Se ha demostrado igualmente que existen los dos tipos de receptores de ET sobre los osteoclastos (Sasaki et al. 1993). ET1 inhibe la resorción ósea osteoclástica y la movilidad celular por su receptor específico en las células osteoclásticas (Alam et al. 1992).

Se ha informado de que ET1 estimula la resorción ósea y disminuye la actividad de la FA in vitro, y de que estimula la proliferación de osteoblastos (Takuwa et al. 1989; Tatrai et al. 1992).

3.2.4 Endotelina 1 y EOP.

Existen dos estudios que sugieren un papel de ET1 en la patogénesis de la EOP.

Un estudio comparó los niveles plasmáticos de ET1 de 11 pacientes con EOP en la fase aguda de la enfermedad frente a 10 sujetos sanos, encontrándose niveles más altos en los pacientes y correlacionándose positivamente con la FA. Además, la presencia de mayores concentraciones de ET1 en pacientes con EOP poliostótica sugiere una relación entre la producción de ET1 y la extensión de la enfermedad. Los autores sugieren que esta elevación de ET1 podría ser el resultado de un intento por parte de los osbeoblastos de contrarrestar la hiperactividad de los osteoclastos. Por otra parte, estos resultados podrían explicarse por el aumento de la producción endotelial debido a la hipervascularización asociada con lesiones pagéticas, aunque los pacientes estudiados no mostraban signos clínicos de aumento del flujo sanguíneo (Tarquini et al. 1998).

En otro estudio con el mismo objetivo se encontraron valores elevados de ET1 en 22 pacientes con EOP en comparación con 19 controles sanos. En un grupo de cinco pacientes con EOP, los niveles plasmáticos de ET1 se determinaron antes y después del tratamiento con pamidronato iv, reduciéndose de promedio los valores de ET1 en un 21% después de las infusiones de pamidronato (Pirzer et al. 2005)

Estos dos estudios sugieren que los niveles de ET1 en plasma pueden indicar actividad en la EOP e incluso usarse como nuevos marcadores de actividad.

3.3 Óxido nítrico.

NO, una especie de gas de nitrógeno reactivo que se produce durante la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina por la enzima óxido nítrico-sintasa (NOS), es una molécula multifuncional de señalización intracelular e intercelular (Moncada 1992).

En el sistema cardiovascular, el NO derivado de las CEs mantiene el tono vascular en la pared del vaso (Palmer et al. 1987), media la contractilidad del músculo liso (Prast et al. 2001), es un factor proangiogénico, inhibe la adhesión de leucocitos (De Caterina et al. 1995), y la agregación plaquetaria (Ignarro 2002; Radomski et al. 1987). En el sistema nervioso central, NO ejerce efectos de neurotransmisión (Jaffrey et al. 1995; Paakkari et al. 1995). NO también media en la función del sistema inmunológico (Wei et al. 1995), produciéndose altos niveles tras la estimulación de las células inmunes por distintas citoquinas proinflamatorias para participar como un segundo mensajero en diversos eventos inflamatorios, así como en la defensa contra diferentes tipos de patógenos, incluyendo bacterias y virus (Nathan et al. 1991; Saura et al. 1999).

3.3.1 Óxido nítrico sintasa.

NOS es la enzima responsable de la producción de NO y se conocen tres isoformas. NOS endotelial (eNOS, NOS3) y NOS neuronal (nNOS, NOS1)

son dos enzimas que se expresan de forma constitutiva, produciendo constantemente bajos niveles de NO. La isoforma inducible (iNOS) permanece inhibida hasta que ciertos estímulos inducen la expresión de la enzima y, sólo en ese momento, se producen altos niveles de NO (Hattori et al. 1994). Aunque estas enzimas tienen actividad catalítica similar, el que estén codificadas por tres genes distintos y tengan una distribución específica en distintos tejidos sugiere que el NO generado por las diferentes isoformas de NOS puede tener diferentes funciones.

La actividad de eNOS y nNOS es regulada principalmente por los cambios en la concentración de Ca ++ intracelular libre (Feelisch 1996). Sin embargo, se ha demostrado que eNOS también puede ser activada tras su fosforilación por ciertas citoquinas a través de la vía intracelular mediada por 1,4,5-trifosfato de inositol (Michell et al. 1999). Poco se sabe de los factores que regulan la expresión de nNOS a nivel transcripcional, sin embargo sí se ha demostrado que el promotor del gen eNOS contiene varios elementos de respuesta a estrógenos y al estrés de cizallamiento (Hayashi et al. 1995; Uematsu et al. 1995).

La regulación de iNOS se lleva a cabo principalmente a nivel de la transcripción del gen iNOS, que se activa por citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, TNF, IFNγ y endotoxina, mientras que los glucocorticoides y citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4 , IL-10 y TGF, la inhiben. Además, se piensa que la vía de iNOS es capaz de generar cantidades mucho mayores de NO durante un período de tiempo más prolongado que la NOS constitutiva (Moncada 1992).

3.3.2 Expresión de NOS en el hueso.

Tanto eNOS como iNOS se expresan ampliamente en las células del estroma de la médula ósea, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, mientras que la expresión de nNOS está restringida a las células que recubren el hueso (linning cells) y los osteoclastos (Fox et al. 1998; Helfrich et al. 1997; Saura et al. 2010).

Existe el consenso de que, en que en condiciones fisiológicas, eNOS probablemente representa la principal actividad de la NOS en la regulación de la formación de hueso (Riancho et al. 1995).

La relevancia de iNOS está relacionada con los procesos en los que los estímulos proinflamatorios juegan un papel fundamental, como en el caso de la curación de las fracturas, en las que la falta de iNOS se encuentra asociada con la alteración de la cicatrización en ratones (Baldik et al. 2005).

También se ha sugerido un posible papel de nNOS en el recambio óseo (van't Hof et al. 2004), más específicamente sobre la actividad de los osteoclastos (Jung et al. 2003), a pesar de que se expresa constitutivamente a niveles muy bajos en células óseas.

Estudios recientes apuntan a eNOS como la principal fuente de NO en la regulación de la resorción ósea, siendo producido por las células osteoprogenitoras y por los osteoblastos (Rubin et al. 2003). Sin embargo, también se ha demostado que los osteoclastos producen NO a través de iNOS, que es, probablemente, la isoforma más importante en el control de la function de los osteoclastos. (Jung et al. 2003).

3.3.3 Efectos de NO en el hueso.

Los efectos de NO sobre el remodelado óseo se ejercen de forma general por la activación de mediadores locales y segundos mensajeros presentes en las células óseas.

Existe una clara evidencia sobre la implicación de NO en el desarrollo del hueso, la curación del hueso, y la resorción ósea (Collin-Osdoby et al. 1995; van't Hof et al. 2001).

Además, NO es un factor clave en la progresión de enfermedades óseas inflamatorias (Armour et al. 2001).

Por otro lado, tanto los efectos antiresortivos como los efectos anabólicos de los estrógenos sobre el hueso pueden estar mediados, en parte, por el NO derivado de la vía eNOS (Armour et al. 2001).

Durante la diferenciación de los condrocitos, la ECM del cartílago se degrada parcialmente y es colonizada por los osteoblastos, osteoclastos, y los vasos sanguíneos, y NO se ha implicado en este proceso (Wang et al. 2004).

3.3.4 Efectos de NO en osteoblastos y osteocitos.

Estudios con osteoblastos derivados de ratones knockout del gen eNOS confirmaron el importante papel de esta enzima en la proliferación y diferenciación de osteoblastos (Afzal et al. 2004; Aguirre et al. 2001; Armour et al. 2001).

NO parece tener efectos bifásicos sobre la actividad de los osteoblastos, estando implicado de forma simultánea en su proliferación y apoptosis. Esta aparente discrepancia puede estar relacionada con la concentración y velocidad a la que se libera NO (Chang et al. 2006; Damoulis et al. 1997).

Las pequeñas cantidades de NO que se producen constitutivamente por los osteoblastos, fundamentalmente por eNOS, pueden actuar como un estimulador autocrino de crecimiento y producción de citoquinas (Buttery et al. 1999; Riancho et al. 1995). La síntesis de NO puede ser inducida en los osteoblastos y en los osteocitos por tensión mecánica y tensión de cizallamiento, principalmente a través de eNOS, pudiendo aumentar la ganancia de hueso al inhibir las acciones de la prostaglandinas sobre la resorción ósea (Ralston et al. 1996; Zaman et al. 1999). Además, se ha comprobado que los osteoblastos responden a este tipo de estímulos mediante la activación de HIF-1a, que va a promover la producción de VEGFA (Wang et al. 2004).

Sin embargo, las altas concentraciones de NO, tales como las observadas después de la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, producidas fundamentalmente por iNOS, tienen potentes efectos inhibidores sobre el crecimiento y la diferenciación de osteoblastos, efectos pro-apoptóticos (Mancini et al. 2000), y, además, van a favorecer la expresión de proteasas colagenolíticas, lo que lleva a una mayor destrucción del tejido (Ho et al. 2005; Lin et al. 2003). Todo esto suprimirá la formación de hueso, tal y como ocurre en diferentes condiciones patológicas.

3.3.5 Efectos de NO en osteoclastos.

NO se ha implicado en la función de los osteoclastos en condiciones normales y patológicas (Collin-Osdoby et al. 1995).

Debido a la heterogeneidad de los métodos y los animales utilizados en distintos estudios, el papel de las isoformas de NOS en la función de los osteoclastos sigue siendo poco clara, aunque también es posible que NO ejerza distintas acciones sobre los osteoclastos dependiendo del tiempo que permanezca actuando sobre esas células.

Estudios en médula de ratón sugieren que NO ejerce un efecto bifásico sobre la actividad de los osteoclastos (Ralston et al. 1995), existiendo actualmente un consenso emergente que sugiere que NO tiene un efecto bifásico sobre la resorción ósea, produciendo la inhibición a altas concentraciones de NO y la estimulación o potenciación a concentraciones más bajas (Calabrese 2001; Chae et al. 1997; Collin-Osdoby et al. 2000; van't Hof et al. 2000).

La producción constitutiva de NO dentro de los osteoclastos es esencial para su normal funcionamiento (Brandi et al. 1995). Las bajas concentraciones de NO aumentan la fusión de pre-osteoclastos y la formación de osteoclastos multinucleados (Nilforoushan et al. 2009), potencian la resorción ósea inducida por IL-1 (Ralston et al. 1995) y estimulan la motilidad de los osteoclastos (Yaroslavskiy et al. 2005).

Sin embargo, las altas concentraciones de NO, producidas por la expresión de iNOS de forma autocrina en los osteoclastos en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, inhiben la formación y la actividad de los osteoclastos (Sunyer et al. 1996; Yaroslavskiy et al. 2004), en parte por la modificación e inhibición de la catepsina K (Percival et al. 1999). Estas altas concentraciones de NO también promueven la apoptosis de los progenitores de osteoclastos (van't Hof et al. 1997) y regulan la apoptosis osteoclástica (Kanaoka et al. 2000).

NO provoca el desprendimiento de los osteoclastos y termina la actividad de degradación del hueso (Brandi et al. 1995). Los efectos de NO sobre la supervivencia celular se observaron en los pre-osteoclastos y los osteoclastos (van't Hof et al. 1997).

Está claro que la exposición continua a altas concentraciones de NO provoca la muerte celular osteoclástica (Mentaverri et al. 2003; van't Hof et al. 1997), pero no están claros los efectos de NO sobre la fisiología celular osteoclástica en concentraciones inferiores y reversibles. De hecho, a altas concentraciones de NO, éste inhibe la formación de hueso y regula la apoptosis osteoclástica (van't Hof et al. 2001; Kanaoka et al. 2000).

3.3.6 eNOS y EOP.

A pesar de lo expuesto anteriormente, no hemos encontrado ninguna referencia sobre el posible papel de NO en la EOP. No obstante, teniendo en cuenta la influencia de las distintas isoformas de NOS sobre las células óseas, es muy probable que estén de algún modo alteradas en una enfermedad en la que existe una intensa actividad osteoclástica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EOP es una entidad clínica en la que en alguna de sus fases se observa una intensa actividad metabólica ósea, osteoclástica y osteoblástica, acompañada de una hipervascularización en el lugar de la lesión ósea. A pesar de la ausencia de datos sobre la relación entre la actividad celular ósea y la vascularización en la EOP, ambos procesos deben estar relacionados.

Existe evidencia sobre la relación de ambos procesos en otras situaciones óseas tanto fisiológicas como patológicas. Además de lo ya expuesto, pueden destacarse también el que la actividad osteoclástica sea capaz de estimular la angiogénesis a través de la matriz-metaloproteinasa 9 (MMP9) e indirectamente al liberar VEGF de la matriz ósea. Por otro, una molécula inhibidora de los osteoclastos como la OPG puede inhibir la apoptosis de las células endoteliales y facilitar la angiogénesis (Scatena et al. 2002; Benslimane-Ahmin et al. 2011).

Por último, se ha demostrado que los BSFs tienen propiedades antiangiogénicas in vivo e in vitro (Hamma-Kourbali et al. 2003; Wood et al. 2002). Además, al suprimir la expresión de MMP9 e inhibir su actividad proteolítica, van a impedir que ésta movilice el VEGF atrapado en la ECM (Teronen et al. 1998), por lo que, además de su efecto sobre los osteoclastos, su efectividad en la EOP también podría estar mediada a través de este efecto antiangiogénico.

A la vista de estas premisas, nuestra hipótesis de trabajo es que puede existir una asociación entre las distintas variantes de los genes reguladores de la angiogénesis (eNOS, VEGFA, VEGFR2 y ET1) y la EOP. Estas diferencias pueden ser en comparación con la población sana o, incluso, con diferentes fenotipos de la enfermedad.

En nuestro trabajo pretendemos evaluar la relación entre los SNPs de genes que regulan la angiogénesis, potencialmente involucrados en la actividad de la osteogéneis, en relación con el desarrollo de EOP y con el fenotipo de la EOP en una cohorte de pacientes de Salamanca.

El objetivo principal concreto de este trabajo es conocer si existe relación entre el desarrollo de EOp, sus características clínicas y epidemiológicas y las variantes genéticas de eNOS, VEGFA, VEGFR2 y ET1.

PACIENTES Y MÉTODOS

1 Pacientes y controles.

En nuestro estudio hemos incluido un total de 264 pacientes atendidos entre enero de 1990 y enero de 2014 en la consulta de Reumatología del Hospital Universitario de Salamanca. La población estudiada en este trabajo proviene en su mayoría de la provincia de Salamanca y de su foco de alta prevalencia, la Comarca de Vitigudino.

Como controles para el estudio de SNPs seleccionamos a 150 personas.

1.1 Criterios de selección.

Todos los pacientes tienen un diagnóstico probado de EOP. De las distintas familias con EOP que se incluyen en nuestro estudio sólo evaluamos a uno de sus integrantes para evitar el sesgo genotípico de los individuos de una misma familia.

En el caso de los controles, son mayores de 40 años, no padecen ninguna enfermedad ósea metabólica ni tienen antecedentes familiares de EOP.

Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las regulaciones legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

1.2 Definiciones.

1.2.1 Diagnóstico probado de EOP.

Se consideró diagnóstico probado de EOP a la elevación de los marcadores de formación o resorción ósea y una imagen gammagráfica compatible con EOP en ausencia de otras enfermedades óseas.

1.2.2 Definición de enfermedad activa.

Se consideró enfermedad activa cuando existía una elevación de FA total sobre el límite superior de la normalidad.

1.2.3 Definición de enfermedad inactiva.

Se consideró enfermedad inactiva cuando los niveles de FA total fueran iguales o inferiores al límite superior de la normalidad.

2 Método.

2.1 Recogida de datos.

Se realizó un estudio retrospectivo con recogida de datos epidemiológicos (fecha de nacimiento, lugar de nacimiento y residencia, sexo, número de historia, familiares afectos de EOP y establecimiento del árbol genealógico), clínicos (motivo del diagnóstico, año del diagnóstico, médico diagnosticador, clínica asociada, complicaciones, tratamientos recibidos, motivo de la indicación del tratamiento y fecha de inicio de cada tratamiento), de laboratorio (FA, calcio, vitamina D, marcadores de remodelado óseo), radiológicos, gammagráficos y resultados del estudio de polimorfismos del ácido desoxirribonucleíco (DNA).

Los datos de laboratorio correspondientes a la FA se estandarizaron al variar la técnica de laboratorio para su determinación a lo largo del estudio. Para ello se recogió el valor fijado como límite superior de la normalidad en cada momento, determinándose el número de veces que la FA estaba por encima de este límite en vez de su valor real.

Para calcular el grado de extensión de la enfermedad se determinó el índice anatómico de Renier (tabla 4), basado en el de Coutris (Renier et al. 1995), el cual da como resultado el porcentaje de afectación sobre un el total del esqueleto.

Tabla.4. Índice anatómico de Renier.

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

*Coeficientes en mujeres.

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

De entre todos los huesos afectados, decidimos poner especial atención a la afectación del cráneo, ya que el cráneo ha sido descrito como el hueso donde la actividad pagética es mayor en el momento del diagnóstico con respecto al hueso normal en los casos de afectación momostótica (Guma et al. 2002).

2.2 Aislamiento del DNA de alto peso molecular.

2.2.1 Obtención de muestras de sangre periférica.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por venopunción, previa firma del consentimiento informado por parte del paciente. Se recogieron 10 ml

de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se conservan a 4ºC hasta su procesamiento.

2.2.2 Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.

Las células nucleadas de la sangre se aíslan mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50ml de agua bidestilada (ddH2O) durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4ºC). Tras la recuperación de la interfase, las células mononucleadas se lavan en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50 mM Tris-HCL pH 7.5; 25mM KCL; 5mM MgCl2; el tampón Fornace da la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos) y se precipitan mediante centrifugación a 580 rpm durante 20 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspende de nuevo en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x106 células/ml.

2.2.3 Aislamiento del DNA de alto peso molecular.

A la muestra obtenida en el paso anterior se añade EDTA (concentración final 10 mM), dodecil sulfato sódico (concentración final 1%) y proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/ml). Esta mezcla se incuba 55ºC durante 8-16 h.

2.2.4 Purificación del DNA.

Tras la incubación anterior se purificó el DNA mediante extracción con fenol- cloroformo/alcohol isoamílico (CIAA) (24:1 v/V), y se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm. Se recuperó la fase acuosa sobrenadante superior (contiene el DNA en solución) evitando la interfase proteica, y se añadió el mismo volumen obtenido de fenol-CIAA. Posteriormente se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Una vez recuperada de nuevo la fase acuosa, el DNA en solución se precipitó mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto al 100% frío (-20ºC). El DNA extraído se lavó con etanol al 70% y, tras una breve centrifugación a 16600 rpm, se dejó evaporar el etanol residual y se disolvió el DNA en tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 1mM) o en agua destilada.

2.2.5 Cuantificación del DNA.

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de DNA/RNA (ND-1000 Spectrophotometer Nanodrop Technologies, Inc. Wilmintong, USA), siguiendo la fórmula:

$$\mu g \text{ de DNA/ml} = (DO_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

DO: densidad óptica.

50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 μg de ADN/ml.

El cociente DO_{260} / DO_{280} se utiliza para el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de ARN, que se elimina tratando la solución de DNA con ARNasa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente.

La muestra de DNA con una concentración aproximada entre 1.000 y 1.500 µg/ml, se almacenó en tubos Eppendorf® a -20ºC, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

2.3 Discriminación alélica de SNP mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas TAQMAN®.

En la PCR con sondas TaqMan®, o sondas de hidrólisis, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia

producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores utilizados para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan® incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Para la discriminación alélica hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En la tabla 5 se describen los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan® los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM (tabla 5).

Tabla.5. Espectros de excitación y emisión de las sondas VIC® y FAM®

Sonda	Espectro de excitación (nm)	Espectro de emisión (nm)
VIC	528	546
FAM	492	515

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq Polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 27).

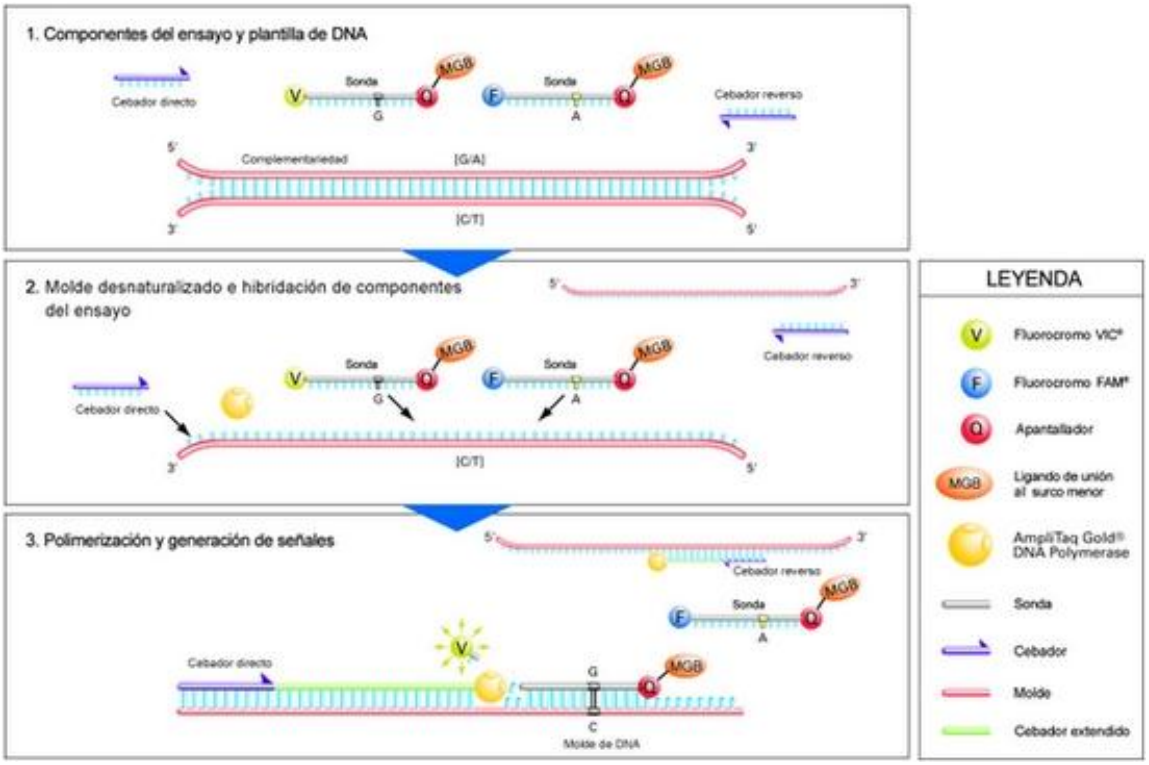

Fig.27. Mecanismo de la reacción PCR con sondas TaqMan®.
Tomado de www.appliedbiosystems.com.

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador automático Biosystem Step One®, siguiendo el mismo esquema para los distintos SNPs:

a) Realización del sustrato:

Se realiza en una placa de 96 pocillos, en la que ponemos como sustrato en cada una de ellas:

- 5 µl del compuesto comercial PCR Taqman®, que proporciona la enzima necesaria para la amplificación (polimerasa Taq).

- 0,25 µl del compuesto comercial que contiene oligonucleótido cebador primer “forward”, oligonucleótido cebador primer “reverse” y las sondas marcadas con fluorocromo de VIC y FAM.

- 4,25 µl de agua destilada.

- 1 µl = 10 ng de ADN (concentración = 10-20 µg/ml). Como control se rellenan ocho celdillas de cada placa con el mismo sustrato, pero sin ADN.

b) Fases del programa:

Se colocó la placa realizada en el Biosystem Step One® en el que nuestras muestras pasan por las siguientes fases (figura 28):

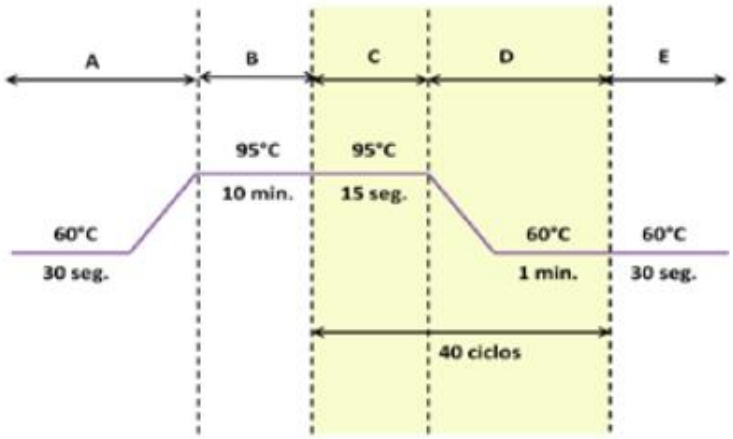

Fig.28. Fases del programa utilizadas en el termociclador.
Tomado de www.appliedbiosystems.com.

c) Análisis:

Se realiza un análisis de la detección de fluoresceína que nos ofrece una representación gráfica que muestra los resultados de la discriminación alélica realizada y su distribución en nuestros tres grupos de estudio, los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro (figura 29).

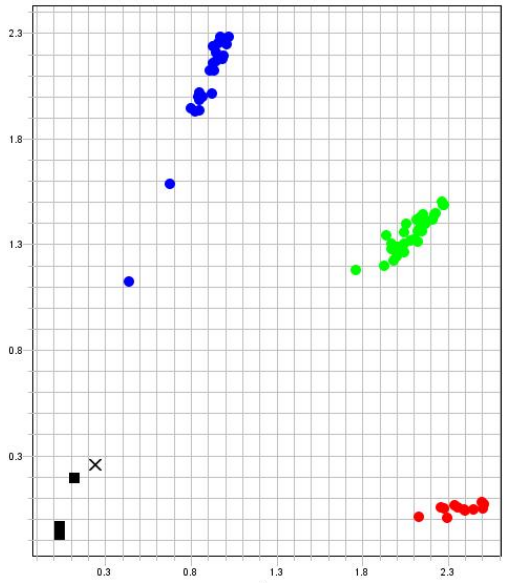

Fig.29. Discriminación alélica del polimorfismo -604T>C (rs2071559).

2.4 SNPs estudiados.

Los SNPs estudiados se muestran en la tabla 6. No existe desequilibrio de ligamiento de estos polimorfismos entre las personas del grupo control.

Tabla.6. SNPs estudiados.

Gen	SNP ID	Cambio de base	SNP	Crom.	Sonda ID	HWE[a]
VEGFA	rs699947	C>A	Promotor	6	C_8311602_10	>0,05
VEGFA	rs833061	C>T	Promotor	6	C_1647381_10	>0,05
VEGFR2	rs2071559	T>C	Promotor	4	C_15869271_10	>0,05
ET1	rs5370	G>T	K198N	6	C_598677_1_	>0,05
eNOS	rs2070744	T>C	Promotor	7	C_15903863_10	>0,05

[a] HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control

2.5 Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva determinándose la media y la desviación estándar para la variables continuas y la frecuencia de aparición en número total y porcentaje para las variables categóricas, así como su intervalo de confianza al 95% cuando fue preciso.

Para valorar la asociación entre las distintas variables categóricas se establecieron las Odds Ratios y sus intervalos de confianza al 95%.

Previo a la comparación de los datos se comprobó la normalidad de las poblaciones mediante el test de Shapiro-Wilk. En caso de distribución normal de la población se utilizó el test χ^2 para la comparación de variables categóricas, el test T de Student para comparar dos variables continuas y el ANOVA para más de dos variables, realizándose un contraste “a posteriori” en caso de que el ANOVA fuera estadísticamente significativo.

En caso de presentar una distribución anormal se utilizó el test χ^2, junto con el test exacto de Fisher y la corrección de Yates cuando fue preciso para la comparación de variables categóricas, el test U de Mann-Whitney para comparar dos variables continuas y el de Kruskall-Wallis para más de dos variables.

El valor crítico de significación estadística se estableció en una $p < 0,05$

El análisis fue realizado con el paquete estadístico SPSS v.18.0.

RESULTADOS

1 Datos clínicos y epidemiológicos.

En la tabla 7 se muestran los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes incluidos en nuestro estudio.

En nuestra cohorte se observa un ligero predominio de mujeres, siendo la edad media del diagnóstico los 67,5 años. El 20% de los pacientes tenían antecedentes familiares de EOP.

El principal motivo del diagnóstico fue la elevación de la FA en una analítica rutinaria, seguida por el dolor, que en muchos casos no se correspondía con dolor óseo propiamente dicho pero que generó la derivación del paciente a la consulta de Reumatología.

Algo más del 80% de los pacientes presentaban una enfermedad activa en el momento del diagnóstico, siendo la media del número de veces que la FA superaba el límite superior de la normalidad de 4.

Casi dos tercios de los pacientes tenían más de una localización ósea alterada, correspondiéndose a una afectación global media de acuerdo al índice anatómico de extensión de Renier del 15,63%.

Una cuarta parte de los pacientes sufría alguna complicación derivada de la EOP, siendo las más frecuentes la coxopatía y la lesión de par craneal.

Tabla.7. Datos epidemiológicos y clínicos.

Sexo	Mujer	143 (54,2%)
	Hombre	121 (45,8%)
Esporádico/Familiar	Esporádico	216 (81,8%)
	Familiar	48 (18,2%)
Edad al diagnóstico	Media	67,51
	DS M	11,68
Motivo del diagnóstico	Elevación FA	151 (57,2%)
	Dolor	53 (20,1%)
	Hallazgo Rx	36 (13,6%)
	Pérdida de audición	3 (1,1%)
	Deformidad	15 (5,7%)
	Fractura	6 (2,3%)
Nº de huesos afectados	Media	2,64
	DS M	2,00
Monostótico vs poliostótico	Monostótico	101 (38,3%)
	Poliostótico	163 (61,7%)
Afectación de cráneo	No	181 (68,6%)
	Si	83 (31,4%)
Ïndice de Renier	Media	15,63
	DS Media	12,03
Activo/Inactivo	Inactivo	50 (18,9%)
	Activo	214 (81,1%)
Veces que supera el límite la FA	Media	4,03
	DS media	5,78
Complicaciones	Si	67 (25,4%)
	No	197 (74,6%)
Presencia de fractura	Si	15 (5,7%)
	No	249 (94,3%)
Lesión par craneal	Si	30 (11,4%)
	No	234 (88,6%)
Coxopatía	Si	27 (10,2%)
	No	237 (89,8%)

En cuanto a la distribución de los huesos afectados en nuestra serie (figura 30), la pelvis fue la localización ósea más frecuentemente afectada por la enfermedad (50,8%) seguida de los fémures (32,6%), cráneo (31,4%) y tibia (30,0%).

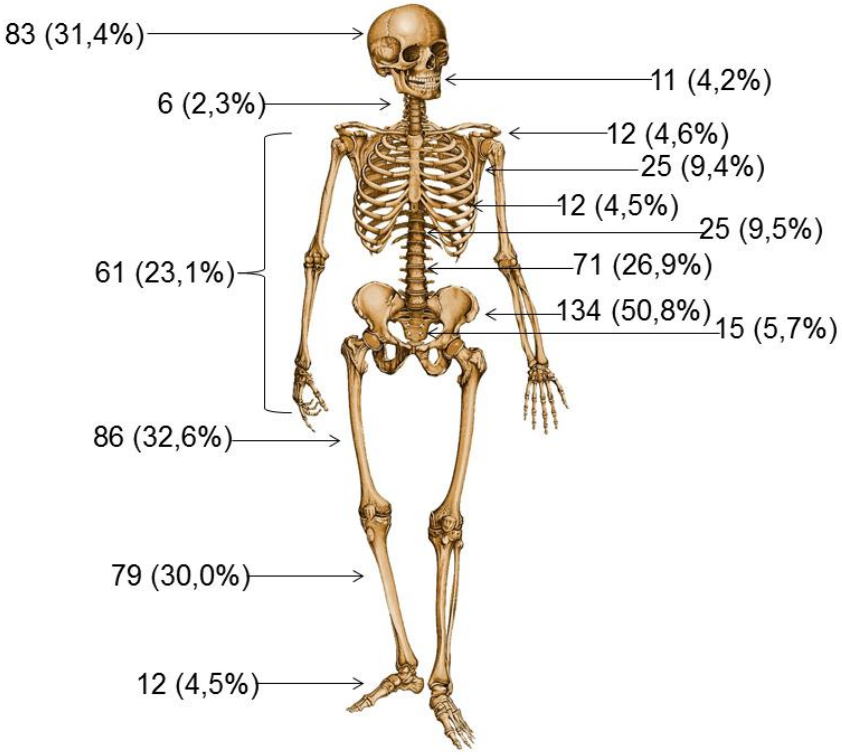

Fig.30. Frecuencia de afectación de los distintos huesos en nuestra cohorte de EOP.

2 Estudio genético.

En la tabla 8 se muestra la comparación de la distribución de genotipos entre los 264 casos y los 125 controles. En ella se puede apreciar como el ser portador del genotipo CC del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 se asocia con mayor riesgo de padecer EOP al hacer el estudio de dominancias y el de codominancia dominante, mientras que no se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.8. Distribución de los genotipos entre controles y pacientes con EOP.

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes EOP	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	41 (27,3%)	60 (22,7%)	0,505	
	AC	69 (46,0%)	123 (46,6%)		
	CC	40 (26,7%)	81 (30,7%)		
	AA+AC	110 (73,3%)	183 (69,3%)	-	
	CC	40 (26,7%)	81 (30,7%)	0,388	
	AA	41 (27,3%)	60 (22,7%)	-	
	AC+CC	109 (72,7%)	204 (77,3%)	0,294	
VEGFA rs833061	CC	41 (27,3%)	63 (23,9%)	0,639	
	CT	69 (46,0%)	121 (45,8%)		
	TT	40 (26,7%)	80 (30,3%)		
	CC+CT	110 (73,3%)	184 (69,7%)	-	
	TT	40 (26,7%)	80 (30,3%)	0,433	
	CC	41 (27,3%)	63 (23,9%)	-	
	CT+TT	109 (72,7%)	201 (76,1%)	0,434	
VEGFR2 rs2071559	TT	38 (25,3%)	56 (21,2%)	-	
	TC	82 (54,7%)	127 (48,1%)	0,845	
	CC	30 (20,0%)	81 (30,7%)	0,043	1,83 (1,02-3,30)
	TT+CC	120 (80,0%)	183 (69,3%)	-	
	CC	30(20,0%)	81 (30,7%)	0,019	1,77 (1,09-2,85)
	TT	38 (25,3%)	56 (21,2%)	-	
	TC+CC	112 (74,7%)	208 (78,8%)	0,336	
ET1 rs5370	GG	80 (53,3%)	151 (57,2%)	0,303	
	GT	57 (38,0%)	100 (37,9%)		
	TT	13 (8,7%)	13 (4,9%)		
	GG+GT	137 (91,3%)	251 (95,1%)	-	
	TT	13 (8,7%)	13 (4,9%)	0,131	
	GG	80 (53,3%)	151 (57,2%)	-	
	GT+TT	70 (46,7%)	113 (42,8%)	0,447	
eNOS rs2070744	TT	55 (36,%)	80 (30,3%)	0,261	
	TC	59 (39,3%)	125 (47,3%)		
	CC	36 (24,0%)	59 (22,3%)		
	TT+TC	114 (76,0%)	205 (77,7%)	-	
	CC	36 (24,0%)	59 (22,3%)	0,701	
	TT	55 (36,%)	80 (30,3%)	-	
	TC+CC	95 (63,3%)	184 (69,7%)	0,184	

En la tabla 9 se muestra la distribución de alelos entre controles y pacientes con EOP. Se observa que ser portador del alelo C del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 se asocia con mayor riesgo de padecer EOP.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.9. Distribución de los alelos entre controles y pacientes con EOP.

SNP	Alelo	Controles	Pacientes EOP	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	151 (50,3%)	243 (46,0%)	-	
	C	149 (49,7%)	285 (54,0%)	0,233	
VEGFA rs833061	C	151 (50,3%)	247 (46,8%)	-	
	T	149 (49,7%)	281 (53,2%)	0,325	
VEGFR2 rs2071559	T	158 (52,7%)	239 (45,3%)	-	
	C	142 (47,3%)	289 (54,7%)	0,041	1,34 (1,01-1,78)
ET1 rs5370	G	217 (72,3%)	402 (76,1%)	-	
	T	83 (27,7%)	126 (23,9%)	0226	
eNOS rs2070744	T	169 (56,4%)	285 (54,0%)	-	
	C	131 (43,6%)	243 (46,0%)	0,513	

En la tabla 10 mostramos la comparación de la distribución de los genotipos de los genes incluidos en el estudio entre pacientes con EOP esporádico y familiar. Al hacer el análisis de dominancias y codominancia del SNP rs5370 del gen ET1 se muestra como ser portador del genotipo TT se asocia con mayor riesgo de desarrollar una EOP familiar.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.10. Distribución de los genotipos entre EOP esporádica y familiar.

SNP	Genotipo	EOP esporádico	EOP familiar	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	49 (81,7%)	11 (18,3%)	0,821	
	AC	99 (80,5%)	24 (19,5%)		
	CC	68 (84,0%)	13 (16,0%)		
	AA+AC	148 (80,9%)	35 (19,1%)	-	
	CC	68 (84,0%)	13 (16,0%)	0,550	
	AA	49 (81,7%)	11 (18,3%)	-	
	AC+CC	167 (81,9%)	37 (18,1%)	0,972	
VEGFA rs833061	CC	52 (82,5%)	11 (17,5%)	0,587	
	CT	96 (79,3%)	25 (20,7%)		
	TT	68 (85,0%)	12 (15,0%)		
	CC+CT	148 (80,4%)	36 (19,6%)	-	
	TT	68 (85,0%)	12 (15,0%)	0,377	
	CC	52 (82,5%)	11 (17,5%)	-	
	CT+TT	164 (81,6%)	37 (18,4%)	0,865	
VEGFR2 rs2071559	TT	50 (89,3%)	6 (10,7%)	0,164	
	TC	104 (81,9%)	23 (18,1%)		
	CC	62 (76,5%)	19 (23,5%)		
	TT+CC	154 (84,2%)	29 (15,8%)	-	
	CC	62 (76,5%)	19 (23,5%)	0,139	
	TT	50 (89,3%)	6 (10,7%)	-	
	TC+CC	166 (81,8%)	42 (20,2%)	0,947	
ET1 rs5370	GG	124 (57,1%)	27 (57,4%)	-	
	GT	87 (40,1%)	13 (27,7%)	0,303	
	TT	6 (2,8%)	7 (14,9%)	0,005	5,35 (1,66-17,21)
	GG+GT	211 (97,2%)	40 (85,1%)	-	
	TT	6 (2,8%)	7 (14,9%)	0,002	6,15 (1,96-19,2)
	GG	124 (57,1%)	27 (57,4%)	-	
	GT+TT	93 (42,9%)	20 (42,6%)	0,970	
eNOS rs2070744	TT	65 (81,3%)	15 (18,8%)	0,371	
	TC	106 (84,8%)	19 (15,2%)		
	CC	45 (76,3%)	14 (23,7%)		
	TT+TC	171 (83,4%)	34 (16,6%)	-	
	CC	45 (76,3%)	14 (23,7%)	0,210	
	TT	65 (81,3%)	15 (18,8%)	-	
	TC+CC	65 (81,3%)	15 (18,8%)	0,875	

En la tabla 11 se muestra la distribución alélica en los pacientes con EOP esporádica y familiar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tabla.11. Distribución de los alelos entre pacientes con EOP esporádica y familiar.

SNP	Alelo	EOP esporádico	EOP familiar	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	197 (45,6%)	46 (49,7%)	-	
	C	235 (54,4%)	50 (52,1%)	0,681	
VEGFA rs833061	C	200 (46,3%)	47 (48,9%)	-	
	T	232 (53,7%)	49 (51,1%)	0,636	
VEGFR2 rs2071559	T	204 (47,2%)	35 (36,5%)	-	
	C	228 (52,8%)	61 (63,5%)	0,055	
ET1 rs5370	G	335 (77,2%)	67 (71,3%)	-	
	T	99 (22,8%)	27 (28,7%)	0,146	
eNOS rs2070744	T	236 (54,6%)	49 (51,1%)	-	
	C	196 (45,4%)	47 (48,9%)	0,535	

En la tabla 12 se muestra la comparación de genotipos entre los pacientes con EOP dependiendo de si se encontraban en fase activa o inactiva en el momento del diagnóstico. En ella se puede apreciar como, al hacer el análisis por dominancias del SNP rs5370 del gen ET1, el ser portador del genotipo TT se asocia a presentar una enfermedad inactiva en el momento del diagnóstico. También se asoció de manera estadísticamente significativa al realizar el análisis por codominancia dominante frente a los genotipos GG+GT.

Al analizar el SNP de eNOS rs2070744, los portadores del genotipo CC presentaron una tendencia muy cercana a la significación estadística de presentar una enfermedad activa en el momento del diagnóstico frente a los portadores de los genotipos TT+TC en el análisis por codominancia dominante.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.12. Distribución genotípica entre los paciente con EOP dependiendo del grado de actividad en el momento del diagnóstico.

SNP	Genotipo	EOP inactivo	EOP activo	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	11 (18,3%)	49 (81,7%)	0,435	
	AC	20 (16,3%)	103 (83,7%)		
	CC	19 (23,5%)	62 (76,5%)		
	AA+AC	31 (16,9%)	152 (83,1%)	-	
	CC	19 (23,5%)	62 (76,5%)	0,213	
	AA	11 (18,3%)	49 (81,7%)	-	
	AC+CC	39 (19,1%)	165 (80,9%)	0,892	
VEGFA rs833061	CC	11 (17,5%)	52 (82,5%)	0,416	
	CT	20 (16,5%)	101 (83,5%)		
	TT	19 (23,8%)	61 (76,3%)		
	CC+CT	31 (16,8%)	153 (86,2%)	-	
	TT	19 (23,8%)	61 (76,3%)	0,585	
	CC	11 (17,5%)	52 (82,5%)	-	
	CT+TT	39 (19,4%)	162 (80,6%)	0,731	
VEGFR2 rs2071559	TT	7 (12,5%)	49 (87,5%)	0,345	
	TC	25 (19,7%)	102 (80,3%)		
	CC	18 (22,2%)	63 (77,8%)		
	TT+CC	32 (17,5%)	151 (82,5%)		
	CC	18 (22,2%)	63 (77,8%)	0,365	
	TT	7 (12,5%)	49 (87,5%)		
	TC+CC	43 (20,7%)	165 (79,3%)	0,166	
ET1 rs5370	GG	25 (50,0%)	126 (58,9%)	-	
	GT	19 (38,0%)	81 (37,9%)	0,618	
	TT	6 (12,0%)	7 (3,3%)	0,014	0,23 (0,07-0,74)
	GG+GT	44 (88,0%)	207 (96,7%)	-	
	TT	6 (12,0%)	7 (3,3%)	0,016	0,24 (0,07-0,77)
	GG	25 (50,0%)	126 (58,9%)	-	
	GT+TT	25 (50,0%)	88 (41,1%)	0,255	
eNOS rs2070744	TT	17 (21,3%)	63 (78,8%)	0,149	
	TC	27 (21,6%)	98 (78,4%)		
	CC	6 (10,2%)	53 (89,8%)		
	TT+TC	44 (21,5%)	161 (78,5%)	-	
	CC	6 (10,2%)	53 (89,8%)	0,051	
	TT	17 (21,3%)	63 (78,8%)	-	
	TC+CC	33 (17,9%)	151 (82,1%)	0,528	

En la tabla 13 se muestra la distribución alélica de los pacientes EOP dependiendo de si han sido diagnosticados en la fase activa o inactiva de la enfermedad. Obtuvimos resultados estadísticamente significativos al estudiar el SNP rs2070744 del gen eNOS, asociándose el ser portador del alelo C a presentar una enfermedad activa en el momento del diagnóstico.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.13. Frecuencia alélica entre pacientes con EOP activa o inactiva en el momento del diagnóstico.

SNP	Alelo	EOP inactivo	EOP activo	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	42 (42,0%)	201 (46,9%)	-	
	C	58 (58,0%)	227 (53,1%)	0,370	
VEGFA rs833061	C	42 (42,0%)	205(47,9%)	-	
	T	58 (58,0%)	223 (52,1%)	0,287	
VEGFR2 rs2071559	T	39 (39,0%)	200 (46,7%)	-	
	C	61 (61,0%)	228 (53,3%)	0,162	
ET1 rs5370	G	69 (69%)	333 (77,8%)	-	
	T	31 (31%)	95 (22,2%)	0,064	
eNOS rs2070744	T	61 (61,0%)	224 (52,3%)	-	
	C	39 (39,0%)	204 (47,7%)	0,009	1,84 (1,17-2.92)

En la tabla 14 se muestra la distribución genotípica de los SNPs estudiados en función de que los pacientes con EOP tuviesen una enfermedad monostótica o poliostótica. No encontramos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de genotipos por dominancias ni por codominancias.

Tabla.14. Frecuencias genotípicas entre EOP monostótica o poliostótica.

SNP	Genotipo	EOP monostótico	EOP poliostótico	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	25 (41,7%)	35 (58,3%)	0,825	
	AC	46 (37,4%)	77 (62,6%)		
	CC	30 (37,0%)	51 (63%)		
	AA+AC	71 (38,8%)	112 (61,2%)	-	
	CC	30 (37,0%)	51 (63%)	0,786	
	AA	25 (41,7%)	35 (58,3%)	-	
	AC+CC	76 (37,3%)	128 (62,7%)	0.537	
VEGFA rs833061	CC	25 (39,7%)	38 (60,3%)	0,941	
	CT	45 (37,2%)	76 (62,8%)		
	TT	31 (38,8%)	49 (61,2%)		
	CC+CT	70 (38,0%)	114 (62,0%)	-	
	TT	31 (38,8%)	49 (61,2%)	0,914	
	CC	25 (39,7%)	38 (60,3%)	-	
	CT+TT	76 (37,8%)	125 (62,2%)	0,790	
VEGFR2 rs2071559	TT	26 (46,4%)	30 (56,6%)	0,344	
	TC	47 (33,0%)	80 (63,0%)		
	CC	28 (34,6%)	53 (65,4%)		
	TT+CC	73 (39,9%)	110 (60,1%)		
	CC	28 (34,6%)	53 (65,4%)	0,412	
	TT	26 (46,4%)	30 (56,6%)		
	TC+CC	75 (36,1%)	133 (63,9%)	0,156	
ET1 rs5370	GG	52 (34,4%)	99 (65,6%)	0,328	
	GT	43 (43%)	57 (57%)		
	TT	6 (46,2%)	7 (53,8%)		
	GG+GT	95 (37,8%)	156 (62,2%)	-	
	TT	6 (46,2%)	7 (53,8%)	0,548	
	GG	52 (34,4%)	99 (65,6%)	-	
	GT+TT	49 (43,4%)	64 (56,6%)	0,140	
eNOS rs2070744	TT	24 (30,0%)	56 (70,0%)	0,130	
	TC	55 (44,0%)	70 (56,0%)		
	CC	22 (37,3%)	37 (62,7%)		
	TT+TC	79 (38,5%)	126 (61,5%)	-	
	CC	22 (37,3%)	37 (62,7%)	0,862	
	TT	24 (30,0%)	56 (70,0%)	-	
	TC+CC	77 (41,8%)	107 (58,2%)	0,069	

En la tabla 15 se muestra la distribución alélica entre los pacientes con EOP monostótica vs poliostótica. No hallamos diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los 5 SNPs estudiados.

Tabla.15. Distribución de los alelos entre EOP monostótica o poliostótica.

SNP	Alelo	EOP monostótico	EOP poliostótico	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	96 (47,5%)	147 (45,1%)	-	
	C	106 (52,5%)	179 (54,9%)	0,586	
VEGFA rs833061	C	95 (47,1%)	152 (46,6%%)	-	
	T	107 (52,9%)	174 (53,4%%)	0,928	
VEGFR2 rs2071559	T	99 (49,9%)	140 (42,9%)	-	
	C	103 (50,1)	186 (57,1%)	0,174	
ET1 rs5370	G	147 (72,7%)	255 (78,2%)	-	
	T	55 (27,2%)	71 (21,8%)	0,153	
eNOS rs2070744	T	103 (51,0%)	182 (55,8%)	-	
	C	99 (49,0%)	144 (44,2%)	0,278	

Al estudiar la distribución de genotipos de acuerdo con la presencia de afectación craneal (tabla 16) se puede observar que el genotipo AC del SNP rs69947 del gen VEGFA se asocia con mayor incidencia de afectación craneal comparado con el genotipo AA (análisis por dominancias y por codominancia recesiva).

Al analizar el SNP rs833061 del gen VEGFA obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis por dominancias y por codominancia recesiva, asociándose el genotipo CT a padecer enfermedad a nivel de cráneo.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.16. Frecuencias genotípicas de los pacientes con o sin afectación craneal.

SNP	Genotipo	No afectación	Afectación cráneo	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	49 (27,1%)	11 (13,3 %)	-	
	AC	76 (42,0%)	47 (56,6%)	0,008	2,75 (1,30-5,82)
	CC	56 (30,9%)	25 (30,1%)	0,095	
	AA+AC	125 (69,1%)	58 (69,9%)	-	
	CC	56 (30,9%)	25 (30,1%)	0,893	
	AA	49 (27,1%)	11 (13,3 %)	-	
	AC+CC	132 (72,9%)	72 (86,7%)	0,015	2,43 (1,19-4,96)
VEGFA rs833061	CC	50 (27,6%)	13 (15,7%)	-	
	CT	76 (42,0%)	45 (54,2%)	0,024	2,27 (1,11-4,64)
	TT	55 (30,4%)	25 (30,1%)	0,156	
	CC+CT	126 (69,6%)	58 (69,9%)	-	
	TT	55 (30,4%)	25 (30,1%)	0,965	
	CC	50 (27,6%)	13 (15,7%)	-	
	CT+TT	131 (72,4%)	70 (84,3%)	0,037	2,05 (1,04-4,03)
VEGFR2 rs2071559	TT	41 (73,2%)	15 (26,8%)	0,691	
	TC	86 (67,7%)	41 (32,3%)		
	CC	54 (66,7%)	27 (33,3%)		
	TT+CC	127 (69,4%)	56 (30,6%)		
	CC	54 (66,7%)	27 (33,3%)	0,659	
	TT	41 (73,2%)	15 (26,8%)		
	TC+CC	140 (67,3%)	68 (32,7%)	0,398	
ET1 rs5370	GG	98 (64,9%)	53 (35,1%)	0,206	
	GT	75 (75,0%)	25 (25,0%)		
	TT	8 (61,5%)	5 (38,5%)		
	GG+GT	173 (68,9%)	78 (31,1%)	-	
	TT	8 (61,5%)	5 (38,5%)	0,576	
	GG	98 (64,9%)	53 (35,1%)	-	
	GT+TT	83 (73,5%)	30 (26,5%)	0,139	
eNOS rs2070744	TT	51 (63,7%)	29 (36,3%)	0,537	
	TC	88 (70,4%)	37 (29,6%)		
	CC	42 (71,2%)	17 (28,8%)		
	TT+TC	139 (67,8%)	66 (32,2%)	-	
	CC	42 (71,2%)	17 (28,8%)	0,622	
	TT	51 (63,7%)	29 (36,3%)	-	
	TC+CC	130 (70,7%)	54 (29,3%)	0,267	

En la tabla 17 se muestra la distribución alélica de los pacientes con EOP dependiendo de si tienen o no afectación del cráneo. No encontramos diferencias estadísticamente significativas al hacer el análisis por alelo de ninguno de los SNPs.

Tabla.17. Distribución alélica en los pacientes EOP con o sin afectación de cráneo.

SNP	Alelo	No afectación	Afectación cráneo	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	174 (48,1%)	69 (41,6%)	-	
	C	188 (51,9%)	97 (58,4%)	0,165	
VEGFA rs833061	C	176 (48,6%)	71 (42,8%)	-	
	T	186 (51,4%)	95 (57,2%)	0,212	
VEGFR2 rs2071559	T	168 (51,5%)	71 (42,8%)	-	
	C	194 (48,5%)	95 (57,2%)	0,436	
ET1 rs5370	G	271 (74,8%)	131 (78,9%)	-	
	T	91 (25,2%)	35 (21,1%)	0,253	
eNOS rs2070744	T	190 (58,3%)	95 (57,3%)	-	
	C	136 (41,7%)	71 (42,7%)	0,823	

Al realizar el estudio de la distribución de genotipos de los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de complicaciones, la tabla 18 muestra diferencias estadísticamente significativas en la distribución del SNP rs2071559 del gen VEGFR2, con una mayor frecuencia del genotipo TT en los pacientes que no desarrollaron complicaciones (análisis por dominancias) frente a los genotipos TC y CC. Al hacer el análisis por codominancia recesiva, encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar a los pacientes con los genotipos TC + CC frente a los pacientes con el genotipo TT, asociándose lo primero con la aparición de complicaciones.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.18. Distribución por genotipos en función de la presencia de complicaciones.

SNP	Genotipo	No complicaciones	Si complicaciones	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	46 (76,7%)	14 (23,3%)	0,379	
	AC	87 (70,7%)	36 (29,3%)		
	CC	64 (79,0%)	17 (21,0%)		
	AA+AC	133 (72,7%)	50 (27,3%)	-	
	CC	64 (79,0%)	17 (21,0%)	0,275	
	AA	46 (76,7%)	14 (23,3%)	-	
	AC+CC	151 (74,0%)	53 (26,0%)	0,679	
VEGFA rs833061	CC	47 (74,6%)	16 (25,4%)	0,551	
	CT	87 (71,9%)	34 (28,1%)		
	TT	63 (78,8%)	17 (21,3%)		
	CC+CT	132 (72,8%)	50 (27,2%)	-	
	TT	63 (78,8%)	17 (21,3%)	0,309	
	CC	47 (74,6%)	16 (25,4%)	-	
	CT+TT	150 (74,6%)	51 (25,4%)	0,997	
VEGFR2 rs2071559	TT	50 (25,4%)	6 (9%)	-	
	TC	92 (46,7%)	35 (52,2%)	0,015	3,17 (1,24-8,05)
	CC	55 (27,9%)	26 (38,8 %)	0,005	3,93 (1,49-10,35)
	TT+CC	142 (72,1%)	41 (61,2%)	-	
	CC	55 (27,9%)	26 (38,8 %)	0,097	
	TT	50 (25,4%)	6 (9%)	-	
	TC+CC	147 (74,6%)	61 (91,0%)	0,007	3,45 (1,40-8,48)
ET1 rs5370	GG	115 (76,2%)	36 (23,8%)	0,768	
	GT	73 (73,0%)	27 (27,0%)		
	TT	9 (69,2%)	4 (39,8%)		
	GG+GT	188 (74,9%)	63 (25,1%)	-	
	TT	9 (69,2%)	4 (39,8%)	0,647	
	GG	115 (76,2%)	36 (23,8%)	-	
	GT+TT	82 (72,6%)	31 (27,4%)	0,507	
eNOS rs2070744	TT	58 (72,5%)	22 (27,5%)	0,402	
	TC	91 (72,8%)	34 (27,2%)		
	CC	48 (81,4%)	11 (18,6%)		
	TT+TC	149 (72,7%)	56 (27,3%)	-	
	CC	48 (81,4%)	11 (18,6%)	0,177	
	TT	58 (72,5%)	22 (27,5%)		
	TC+CC	139 (75,5%)	0,602		

En la tabla 19 se muestra la distribución alélica de los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de complicaciones de forma global. En ella podemos observar como existen diferencias estadísticamente significativas al estudiar el SNP VEGFR2 rs2071559, asociándose el alelo C a la presencia de complicaciones. No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.19. Distribución alélica en los pacientes con EOP que presentan o no complicaciones.

SNP	Alelo	EOP sin complicaciones	EOP con complicaciones	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	179 (45,4%)	64 (47,8%)	-	
	C	215 (54,6%)	70(52,2%)	0,640	
VEGFA rs833061	C	181 (45,9%)	66 (49,3%)	-	
	T	213 (54,1%)	68 (50,7%)	0,507	
VEGFR2 rs2071559	T	192 (48,7%)	47 (35,1%)	-	
	C	202 (51,3%)	87 (64,9%)	0,006	1,75 (1,17-2,6%)
ET1 rs5370	G	303 (76,9%)	99 (73,8%)	-	
	T	91 (23,1%)	35 (26,1%)	0,478	
eNOS rs2070744	T	207 (52,5%)	78 (58,2%)	-	
	C	187 (47,5%)	56 (41,8%)	0,255	

La tabla 20 muestra la frecuencia genotípica de los pacientes con EOP según presenten o no fractura como complicación de la enfermedad. No encontramos diferencias estadísticamente significativas al realizar este análisis en ninguno de los SNPs estudiados.

Tabla.20. Distribución genotípica entre los pacientes según presenten o no fractura.

SNP	Genotipo	EOP sin fractura	EOP con fractura	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	55 (91,7%)	5 (8,3%)	0,601	
	AC	117 (95,1%)	6 (4,9%)		
	CC	77 (95,1%)	4 (4,9%)		
	AA+AC	172 (94%)	11 (6,0%)	-	
	CC	77 (95,1%)	4 (4,9%)	0,728	
	AA	55 (91,7%)	5 (8,3%)	-	
	AC+CC	194 (95,1%)	10 (4,9%)	0,313	
VEGFA rs833061	CC	57 (90,5%)	6 (9,5%)	0,309	
	CT	116 (95,9%)	5 (4,1%)		
	TT	76 (95,0%)	4 (5,0%)		
	CC+CT	173 (94,0%)	11 (6,0%)	-	
	TT	76 (95,0%)	4 (5,0%)	0,752	
	CC	57 (90,5%)	6 (9,5%)		
	CT+TT	192 (95,5%)	9 (4,5%)	0,131	
VEGFR2 rs2071559	TT	52 (20,9%)	4 (26,7%)	-	
	TC	124 (49,8%)	3 (20,0%)	0,139	
	CC	73 (29,3%)	8 (53,3%)	0,579	
	TT+CC	176 (70,7%)	7 (46,7%)	-	
	CC	73 (29,3%)	8 (53,3%)	0,059	
	TT	52 (20,9%)	4 (26,7%)	-	
	TC+CC	197 (79,1%)	11 (73,3%)	0,596	
ET1 rs5370	GG	144 (95,4%)	7 (4,6%)	0,351	
	GT	92 (92,0%)	8 (8,0%)		
	TT	13 (100%)	0 (0,0%)		
	GG+GT	236 (94,0%)	15 (6,0%)	-	
	TT	13 (100%)	0 (0,0%)	0,364	
	GG	144 (95,4%)	7 (4,6%)	-	
	GT+TT	105 (92,9%)	8 (7,1%)	0,396	
eNOS rs2070744	TT	72 (90,0%)	8 (10,0%)	0,134	
	TC	120 (96,0%)	5 (4,0%)		
	CC	57 (96,6%)	2 (3,4%)		
	TT+TC	192 (93,7%)	13 (6,3%)		
	CC	57 (96,6%)	2 (3,4%)	0,388	
	TT	72 (90,0%)	8 (10,0%)		
	TC+CC	177 (96,2%)	7 (3,8%)	0,052	

En la tabla 21 figura la distribución de los alelos en los pacientes con EOP en función de si presentan o no fractura. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al hacer las comparaciones por alelos de ninguno de los cinco SNPs estudiados y la presencia de fractura como complicación de la EOP.

Tabla.21. Distribución alélica de los pacientes con EOP con o sin fractura.

SNP	Alelo	EOP sin fractura	EOP con fractura	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	227 (45,6%)	16 (53,3%)	-	
	C	271 (54,4%)	14 (46,7%)	0,408	
VEGFA rs833061	C	230 (46,2%)	17 (56,7%)	-	
	T	268 (53,8%)	13 (43,3%)	0,264	
VEGFR2 rs2071559	T	228 (45,8%)	11 (36,7%)	-	
	C	270 (54,2%)	19 (63,3%)	0,332	
ET1 rs5370	G	380 (76,3%)	22 (73,3%)	-	
	T	118 (23,7%)	8 (26,7%)	0,711	
eNOS rs2070744	T	264 (53,1%)	21 (70,0%)	-	
	C	234 (46,9%)	9 (30,0%)	0,070	

En la tabla 22 se muestra la distribución genotípica entre los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de lesión de par craneal. En ella se observan diferencias estadísticamente significativas al estudiar el SNP VEGFR2 rs2071559, asociándose los portadores de los genotipos TC y CC a la aparición de lesión de par craneal frente a los portadores del genotipo TT al hacer el análisis de dominancias. Al realizar el análisis por codominancia recesiva, los genotipos TC + CC se relacionan con la presencia de lesión de par craneal frente al genotipo TT.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.22. Distribución genotípica dependiendo de presencia lesión de par craneal.

SNP	Genotipo	EOP sin lesión par craneal	EOP con lesión par craneal	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	55 (91,7%)	5 (8,3%)	0,702	
	AC	108 (87,8%)	15 (12,2%)		
	CC	71 (87,7%)	10 (12,3%)		
	AA+AC	163 (89,1%)	20 (10,9%)	-	
	CC	71 (87,7%)	10 (12,3%)	0,738	
	AA	55 (91,7%)	5 (8,3%)	-	
	AC+CC	179 (87,7%)	25 (12,3%)	0,400	
VEGFA rs833061	CC	58 (92,1%)	5 (7,9%)	0,617	
	CT	106 (87,6%)	15 (12,4%)		
	TT	70 (87,5%)	10 (12,5%)		
	CC+CT	164 (89,1%)	20 (10,9%)	-	
	TT	70 (87,5%)	10 (12,5%)	0,701	
	CC	58 (92,1%)	5 (7,9%)	-	
	CT+TT	176 (87,6%)	25 (12,4%)	0,326	
VEGFR2 rs2071559	TT	55(23,5%)	1(%3,3)	-	
	TC	109(46,6%)	18(60,0%)	0,034	9,0 (1,1-69,8)
	CC	70(29,9%)	11(36,7%)	0,042	8,6 (1,0-68,9)
	TT+CC	164 (70,1%)	19 (63,3%)	-	
	CC	70(29,9%)	11(36,7%)	0,452	
	TT	55(23,5%)	1(%3,3)	-	
	TC+CC	179 (76,5%)	29 (96,7%)	0,033	8,91 (1,18-66,9)
ET1 rs5370	GG	132 (87,4%)	19 (12,6%)	0,611	
	GT	91 (91,0%)	9 (9,0%)		
	TT	11 (84,6%)	2 (15,4%)		
	GG+GT	223 (88,8%)	28 (11,2%)	-	
	TT	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,639	
	GG	132 (87,4%)	19 (12,6%)	-	
	GT+TT	102 (90,3%)	11 (9,7%)	0,471	
eNOS rs2070744	TT	74 (92,5%)	6 (7,5%)	0,299	
	TC	107 (85,6%)	18 (14,4%)		
	CC	53 (89,8%)	6 (10,2%)		
	TT+TC	181 (88,3%)	24 (11,7%)		
	CC	53 (89,8%)	6 (10,2%)	0,743	
	TT	74 (92,5%)	6 (7,5%)		
	TC+CC	160 (87,0%)	24 (13,0%)	0,192	

Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al analizar la distribución alélica de los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de lesión de par craneal como complicación de la enfermedad de tal forma que los portadores del alelo C presentan con más frecuencia lesión de par craneal comparado con los portadores del alelo T (tabla 23).

Tabla.23. Frecuencias alélicas de los pacientes con EOP dependiendo de la presencia o no de lesión de par craneal.

SNP	Alelo	EOP sin lesión par craneal	EOP con lesión par craneal	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	218 (46,6%)	25 (41,7%)	-	
	C	250 (53,4%)	35 (58,3%)	0,472	
VEGFA rs833061	C	222 (47,4%)	25 (41,7%)	-	
	T	246 (52,6%)	35 (58,3%)	0,468	
VEGFR2 rs2071559	T	219 (46,8%)	20 (33,3%)	-	
	C	249 (58,2%)	40 (66,7%)	0,043	1,75 (1,01-3,10%)
ET1 rs5370	G	355 (74,9%)	47 (78,3%)	-	
	T	113 (24,1%)	13 (21,7%)	0,672	
eNOS rs2070744	T	255 (54,5%)	30 (50,0%)	-	
	C	213 (45,5%)	30 (50,0%)	0,511	

En la tabla 24 mostramos la distribución genotípica de los pacientes con EOP en función de si presentan o no coxopatía como complicación de la enfermedad. Encontramos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el SNP VEGFR2 rs2071559, presentando los portadores del genotipo TC una mayor frecuencia de coxopatía comparado con los portadores del genotipo TT al hacer el análisis por dominancias. Al hacer el análisis de este mismo SNP por codominancia recesiva, obtuvimos resultados estadísticamente significativos, presentando los portadores del genotipo TC + CC coxopatía con más frecuencia, comparado con los portadores del genotipo TT.

Tabla.24. Frecuencias genotípicas dependiendo de la presencia de coxopatía.

SNP	Genotipo	No coxopatía	Si coxopatía	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	AA	54 (90,0%)	6 (10%)	0,122	
	AC	106 (86,2%)	17 (13,8%)		
	CC	77 (95,1%)	4 (4,9%)		
	AA+AC	160 (87,4%)	23 (12,6%)	-	
	CC	77 (95,1%)	4 (4,9%)	0,059	
	AA	54 (90,0%)	6 (10%)	-	
	AC+CC	183 (89,7%)	21 (10,3%)	0,947	
VEGFA rs833061	CC	55 (87,3%)	8 (12,7%)	0,181	
	CT	106 (87,6%)	15 (12,4%)		
	TT	76 (95,0%)	4 (5,0%)		
	CC+CT	161 (87,5%)	23 (12,5%)	-	
	TT	76 (95,0%)	4 (5,0%)	0,065	
	CC	55 (87,3%)	8 (12,7%)	-	
	CT+TT	182 (90,5%)	19 (9,5%)	0,458	
VEGFR2 rs2071559	TT	55 (23,2%)	1 (3,7%)	-	
	TC	110 (46,4%)	17 (63,0%)	0,040	8,5 (1,10-65,5)
	CC	72 (30,4%)	9 (33,3%)	0,071	
	TT+CC	165 (69,6%)	18 (66,7%)	-	
	CC	72 (30,4%)	9 (33,3%)	0,753	
	TT	55 (23,2%)	1 (3,7%)	-	
	TC+CC	182 (76,8%)	26 (96,3%)	0,045	7,85 (1,04-59,2)
ET-1 rs5370	GG	138 (91,4%)	13 (8,6%)	0,563	
	GT	88 (8,0%)	12 (12,0%)		
	TT	11 (84,6%)	2 (15,4%)		
	GG+GT	226 (90,0%)	25 (10,0%)	-	
	TT	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,529	
	GG	138 (91,4%)	13 (8,6%)	-	
	GT+TT	99 (87,6%)	14 (12,4%)	0,316	
eNOS rs2070744	TT	69 (86,3%)	11 (13,8%)	0,248	
	TC	112 (89,6%)	13 (10,4%)		
	CC	56 (94,9%)	3 (5,1%)		
	TT+TC	181 (88,3%)	24 (11,7%)		
	CC	56 (94,9%)	3 (5,1%)	0,139	
	TT	69 (86,3%)	11 (13,8%)		
	TC+CC	168 (91,3%)	16 (8,7%)	0,213	

Al estudiar la distribución alélica en los pacientes con EOP dependiendo de si padecen o no coxopatía (tabla 25), no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al hacer el estudio por alelos de ninguno de los cinco SNPs estudiados.

Tabla.25. Frecuencia alélica dependiendo de la presencia o no de coxopatía.

SNP	Alelo	EOP sin coxopatía	EOP con coxopatía	p-valor	OR (95% IC)
VEGFA rs699947	A	214 (45,1%)	29 (53,7%)	-	
	C	260 (54,9%)	25 (46,3%)	0,232	
VEGFA rs833061	C	216 (45,6%)	31 (57,4%)	-	
	T	258 (54,4%)	23 (42,6%)	0,922	
VEGFR2 rs2071559	T	220 (46,4%)	19 (35,2%)	-	
	C	254 (53,6%)	35 (64,8%)	0,119	
ET1 rs5370	G	364 (76,8%)	38 (70,4%)	-	
	T	110 (23,2%)	16 (29,6%)	0,294	
eNOS rs2070744	T	250 (52,7%)	35 (64,8%)	-	
	C	224 (47,2%)	19 (35,2%)	0,092	

En la tabla 26 se muestra la distribución genotípica según la edad al diagnóstico. Encontramos diferencias estadísticamente significativas al hacer el análisis por dominancias del SNP VEGFA rs699947, presentando los portadores del genotipo CC una mayor edad en el momento del diagnóstico comparado con los portadores de los genotipos AA o AC.

No se observan diferencias en el resto de SNPs incluidos en el estudio.

Tabla.26. Distribución genotípica en función de la edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

SNP	Genotipo	Edad al diagnóstico Media (DS)	P valor (ANOVA)	Contrastes[a]
VEGFA rs699947	AA	65,9 (13,0)	0,012	AA-AC: p=1,0 AA-CC: p=0,046 AC-CC: p=0,019
	AC	66,2 (11,2)		
	CC	70,7 (10,8)		
VEGFA rs833061	CC	65,9 (12,8)	0,038	CC-CT: p=1,0 CC-TT: p=0,083 CT-TT: p=0,074
	CT	66,5 (11,4)		
	TT	70,3 (10,8)		
VEGFR2 rs2071559	TT	70,0 (9,8)	0,163	-
	TC	67,2 (11,5)		
	CC	66,3 (12,9)		
ET1 rs5370	GG	67,4 (11,9)	0,218	-
	GT	68,4 (11,2)		
	TT	62,4 (12,4)		
eNOS rs2070744	TT	68,1 (10,3)	0,680	-
	TC	67,7 (11,5)		
	CC	66,4 (13,7)		

[a] Análisis de contrastes por Bonferroni.

En la tabla 27 se muestra la frecuencia genotípica de los pacientes con EOP y la media del número de veces que la FA supera el límite superior de la normalidad. No se observan diferencias estadísticamente significativas al analizar los SNPs incluidos en el estudio con esta variable.

Tabla.27. Distribución genotípica en función del número de veces que supera FA el límite superior de la normalidad.

SNP	Genotipo	Nº de veces que supera FA el límite superior Media (DS)	P valor (ANOVA)	Contrastes[a]
VEGFA rs699947	AA	3,73 (3,6)	0,278	-
	AC	4,63 (7,1)		
	CC	3,36 4,(4,8)		
VEGFA rs833061	CC	3,86 (3,7)	0,431	-
	CT	4,51 (7,1)		
	TT	3,46 (4,5)		
VEGFR2 rs2071559	TT	4,56 (7,3)	0,640	-
	TC	4,07 (5,5)		
	CC	3,61 (5,0)		
ET1 rs5370	GG	3,86 (5,3)	0,070	-
	GT	3,84 (4,5)		
	TT	7,63 14,0)		
eNOS rs2070744	TT	3,96 (6,4)	0,126	-
	TC	3,47 (3,9)		
	CC	5,33 (7,8)		

[a] Análisis de contrastes por Bonferroni.

En la tabla 28 figura la distribución genotípica de los pacientes con EOP y el número de huesos afectados en la gammagrafía ósea. No encontramos diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los SNPs estudiados.

Tabla.28. Frecuencias genotípicas de los pacientes con EOP y número de huesos afectados.

SNP	Genotipo	Nº de huesos afectados Media (DS)	P valor (ANOVA)	Contrastes[a]
VEGFA rs699947	AA	2,38 (1,9)	0,508	-
	AC	2,72 (2,0)		
	CC	2,73 (2,1)		
VEGFA rs833061	CC	2,54 (1,8)	0,872	-
	CT	2,70 (2,1)		
	TT	2,65 (2,1)		
VEGFR2 rs2071559	TT	2,27 (1,7)	0,228	-
	TC	2,82 (2,2)		
	CC	2,64 (1,8)		
ET1 rs5370	GG	2,72 (1,9)	0,775	-
	GT	2,56 (2,1)		
	TT	2,46 (1,8)		
eNOS rs2070744	TT	2,94 (2,1)	0,216	-
	TC	2,44 (1,9)		
	CC	2,70 (1,9)		

[a] Análisis de contrastes por Bonferroni.

En la tabla 29 se muestra la distribución genotípica de los pacientes con EOP de acuerdo con el índice anatómico de Renier. No se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los SNPs estudiados.

Tabla.29. Frecuencias genotípicas de los pacientes con EOP e índice de Renier

SNP	Genotipo	Índice de Renier Media (DS)	P valor (ANOVA)	Contrastes[a]:
VEGFA rs699947	AA	12,81 (10,21)	0,045	AA-AC: p=0,097 AA-CC: p=0,835 AC-CC: p=0,490
	AC	17,4 (13,09)		
	CC	15,62 (11,22)		
VEGFA rs833061	CC	13,51 (10,51)	0,093	-
	CT	17,31 (13,23)		
	TT	14,75 (10,96)		
VEGFR2 rs2071559	TT	14,07 (11,38)	0,554	-
	TC	16,05 (12,27)		
	CC	16,03 (12,12)		
ET1 rs5370	GG	16,52 (12,48)	0,268	-
	GT	14,09 (11,07)		
	TT	16,89 (13,43)		
eNOS rs2070744	TT	17,08 (12,63)	0,305	-
	TC	14,48 (10,99)		
	CC	16,07 (13,20)		

[a] Análisis de contrastes por Bonferroni.

Discusión

La EOP es una enfermedad metabólica relativamente frecuente, que en España afecta a algo más del 1% de la población en riesgo. Se caracteriza por el desarrollo de lesiones óseas localizadas en las que hay una alteración del metabolismo óseo que conduce a la formación de un hueso anómalo, no maduro, aumentado de volumen y con una mala competencia biomecánica.

Desde el punto de vista fisiopatológico, en el hueso pagético se produce una activación anómala de la osteoclastogénesis, en la que hay un desordenado aumento de la frecuencia de activación de las unidades multicelulares básicas, un defecto de la polarización y/o una errática señalización quimiotáctica del lugar de inicio de la osteolisis. Sin embargo, se mantiene el acoplamiento entre el ostoclasto y el osteoblasto, por lo que la formación ósea está acelerada y aumentada, lo que conduce a un hueso desorganizado con pérdida de la laminización del colágeno. La activación osteoclástica se acompaña de una hipervascularización. La lesión pagética evoluciona en el tiempo y la mayor parte de las lesiones acaban en un hueso esclerótico, metabólicamente inactivo y con escasa celularidad. Las características descritas más arriba corresponden al hueso pagético activo de las fases osteolítica y mixta (Del Pino-Montes et al. 2014).

Consideramos que esta hipervascularización expresa una alteración de la angiogénesis ósea que acompaña a la osteoclastogénesis y al desarrollo de la unidad multicelular básica. No conocemos datos acerca de su mecanismo y de si esta alteración es primaria o secundaria a la actividad osteoclástica. El papel de la angiogénesis en la osteoclastogénesis, el desarrollo de la unidad multicelular básica y, en definitiva, el metabolismo óseo, parece ser importante. Por este motivo hemos planteado un estudio de diferentes variantes genéticas relacionadas con el proceso de la angiogénesis en pacientes con EOP, con el objetivo de conocer si pudieran existir asociaciones de algunas de ellas con la expresión fenotípica de la EOP.

La EOP tiene una variable expresión clínica cuyos motivos no son conocidos. Epidemiológicamente, la enfermedad puede ser familiar o aparentemente esporádica. El fenotipo varía en cuanto a la extensión y localización, la edad de comienzo y la actividad de la enfermedad. En nuestro

Servicio tenemos experiencia en el manejo clínico de la EOP y disponemos de los datos de una cohorte de más de 300 pacientes seguidos en los últimos 20 años, que serán la población de estudio de este trabajo.

Nuestro interés radica en conocer si algunas de las posibles variantes genéticas en genes implicados en el proceso de angiogénesis tienen relación con el desarrollo o la expresión fenotípica de la EOP.

1 Datos clínicos y epidemiológicos de nuestra cohorte de EOP.

Los datos clínicos y epidemiológicos de nuestra cohorte son similares a los señalados en la serie española más amplia publicada, el registro nacional de EOP (Del Pino-Montes et al. 2009), y en otras series internacionales (Corral-Gudino et al. 2013). Cabe destacar que en nuestro trabajo se ha descrito un porcentaje de sujetos con EOP familiar de un 18%, que es ligeramente superior al señalado en esta serie, que fue del 14%. Esta diferencia puede explicarse fácilmente, ya que en nuestra serie se incluyen pacientes de un foco de alta prevalencia de EOP, la Comarca de Vitigudino, en la que el porcentaje de casos familiares es mayor (Miron-Canelo et al. 1997).

2 Estudio genético.

Se considera que en el desarrollo de la EOP hay, al menos en parte, una base genética que explica la aparición de casos familiares. En relación con el genotipo de la EOP, estudios previos han asociado la EOP con distintos SNPs, principalmente de los genes que codifican proteínas involucradas en la activación y resorción osteoclástica (Albagha et al. 2013), pero también en otros procesos como en la autofagia (Usategui-Martín et al 2015). La angiogénesis juega un importante papel en la biología ósea y, de algún modo, probablemente en el desarrollo de la lesión pagética, ya que una de las características de la lesión ósea pagética es la hipervascularización. Sin embargo, no hemos encontrado estudios sobre angiogénesis y sus proteínas reguladoras en pacientes con EOP. Por tanto, deberemos discutir nuestros hallazgos en base a la influencia de las variantes genéticas analizadas sobre el metabolismo óseo fisiológico o en otras enfermedades metabólicas óseas como la osteoporosis.

2.1 Gen VEGFA.

VEGF es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante el desarrollo embrionario, el crecimiento postnatal y la homeostasis. VEGF potencia la proliferación, migración y supervivencia de células endoteliales y promueve la permeabilidad vascular (Ferrara et al. 2003). VEGF también juega un papel crítico en el desarrollo óseo (Gerber et al. 1999; Zelzer et al. 2005) y cada vez se conoce más sobre su importancia en enfermedades del metabolismo óseo, como la osteoporosis (Ding et al. 2011; Costa et al. 2009), y en el proceso de reparación ósea (Peng et al. 2005; Street et al. 2002). VEGFA actúa sobre osteoblastos y osteoclastos promoviendo su diferenciación y activación (D'Amore 2007). Es, además, secretado por ambos tipos de células, sirviendo de molécula interconectora entre ellos por un mecanismo paracrino y como molécula autoreguladora por un mecanismo autocrino (Clarkin et al. 2013; Liu et al. 2014; Trebec-Reynolds et al. 2010).

Nosotros hemos estudiado dos SNPs del gen VEGFA, rs699947 y rs833061, localizados en la zona promotora. Sin embargo, parece que ninguno de ellos modifica la expresión transcripcional del gen, y por lo tanto no se modifican los niveles de VEGFA (Al-Habboubi et al. 2011).

Estos SNPs del gen VEGFA se han estudiado fundamentalmente en el ámbito de la oncología. Ambos se han asociado con un aumento del riesgo a padecer cáncer de mama (Schneider et al. 2008), y se han relacionado en mayor o menor medida con la aparición de distintos tumores sólidos al hacer estudios de haplotipos junto con otros SNPs de VEGFA (Jain et al. 2009). El SNP rs699947 del gen VEGFA también se ha asociado con un aumento del riesgo de osteosarcoma (Tie et al. 2014).

A pesar de que VEGFA es el principal candidato a ser el nexo entre la angiogénesis y el proceso de osteogénesis, y a que uno de estos SNPs se asoció con el desarrollo de osteosarcoma (una complicación claramente relacionada con la EOP), no encontramos relación entre los SNPs rs699947 y rs833061 del gen VEGFA y el desarrollo de EOP.

Por otro lado, hemos analizado la frecuencia de estos SNPs en relación a algunas características clínicas de la EOP. Dada la variabilidad de las mismas, consideramos que tanto la extensión esquelética de la enfermedad como la actividad de la misma, y el modo y momento de presentación, pueden tener una base genética.

En este sentido, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los parámetros usados para medir la extensión de la enfermedad (índice de Renier y número de huesos afectos).

Sin embargo, el genotipo AC del SNP rs699947 y el genotipo CT del SNP rs833061, ambos del gen VEGFA, se asociaron con la afectación craneal en la enfermedad, comparado con los genotipos AA y CC respectivamente, tanto al hacer el análisis por dominancias como al hacer el análisis por codominancia recesiva, aunque no resultó así al hacer el estudio por alelos.

Este hallazgo puede ser interesante, ya que el cráneo está totalmente constituido por huesos planos. Una posibilidad sería la de que el endotelio de los capilares de los huesos planos, que tienen un claro predominio de hueso trabecular, tuvieran una relación diferente con la médula ósea y los nichos de células madre en la EOP, quién sabe si en relación a la hipótesis de que dichos capilares pudieran producir VEGF (Clarkin et al. 2013).

Además, esta afectación no tiene la misma explicación etiopatogénica que la del resto de huesos del esqueleto, ya que el factor mecánico, que parece jugar un papel importante en otras localizaciones (Solomon 1979), no puede considerarse en este caso.

Por último, en otra de las series más importantes de nuestro país, el cráneo fue el hueso donde la actividad del hueso pagético fue mayor en el momento del diagnóstico utilizando el índice fosfatásico (Guma et al. 2002). Que el VEGFA tuviera un tropismo especial por los osteoclastos y osteoblastos de la médula ósea de los huesos del cráneo podría explicar la mayor actividad pagética en estos huesos y también que el cráneo sea uno de los huesos que más frecuentemente se ven afectados en la EOP, con un 31,4% de pacientes con afectación craneal en nuestra serie.

Como ya se ha comentado, la historia natural de la EOP se caracteriza por una primera fase en la que predomina el proceso osteolítico, seguida por una fase mixta en la que persiste la actividad osteolítica y se suma un proceso formación de hueso por parte de los osteoblastos. Por último habrá una fase de predomino esclerótico con escasa celularidad y que representa el estado final de la lesión pagética. En las dos primeras fases los marcadores de remodelado óseo van a estar elevados, considerando que la EOP se encuentra activa durante este periodo (Del Pino-Montes et al. 2014). Es probable que en cada fase existan diferencias igualmente marcadas en lo que a la angiogénesis se refiere. Posiblemente exista una mayor y más exuberante angiogénesis en la EOP activa y una estabilización de ésta en la fase blástica.

La duración de estas fases y el momento en el que se produce la transición de una a otra hasta llegar a la fase esclerótica podría tener

igualmente una base genética, en la que los SNPs del gen VEGF y de otros genes reguladores de la angiogénesis podrían ser importantes. En nuestro estudio no encontramos relación entre los SNPs del gen VEGF estudiados y el grado de actividad de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Por otro lado, la EOP suele diagnosticarse en pacientes mayores de 60 años, como ya se ha expuesto. Es posible que la edad de presentación pueda tener, igualmente, una base genética.

Al respecto de esto, en nuestro estudio el genotipo CC del SNP rs699947 del gen VEGFA se asoció con una mayor edad en el momento del diagnóstico. Este SNP podría asociarse a un inicio más tardío de la enfermedad o a una menor expresión fenotípica de la enfermedad que pudiera retrasar el diagnóstico. Sin embargo, dada la variabilidad de las manifestaciones clínicas y la frecuencia con la que el diagnóstico se hace por hallazgos radiológicos o de laboratorio fortuitos, consideramos que este hallazgo es poco consistente.

En cuanto al SNP rs833061 del gen VEGFA, el genotipo CT se asoció con una mayor afectación del cráneo comparado con el genotipo CC al hacer el análisis por dominancias y el análisis por codominancia recesiva, aunque no así al hacer el estudio por alelos. Al igual que se comentó anteriormente y, exponiendo las mismas hipótesis, este resultado habría que analizarlo cuidadosamente.

Por último, hemos observado que ambos SNPs se presentan en la población control con la misma frecuencia genotípica. Esto puede ser debido a que los dos SNPs están en casi perfecto desequilibrio de ligamiento (r2=0,966) en la población general y, muy probablemente, también en nuestro grupo control. En cuanto al grupo de pacientes con EOP, ocurre prácticamente lo mismo, lo que puede justificar que ambos SNPs se asocien con la afectación de cráneo, por lo que podríamos deducir que estos SNPs están también en casi perfecto desequilibrio de ligamiento en nuestra población de pacientes con EOP.

2.2 Gen VEGFR2.

La unión del ligando VEGF con el receptor VEGFR2 produce la dimerización y autofosforilación de éste, seguida de la fosforilación de numerosas proteínas relacionadas con la transducción de señales celulares que promueven diferentes procesos tales como la migración celular, la proliferación y la angiogénesis (Ferrara 2004). Tanto los osteoblastos, los osteoclastos, y los precursores de ambos tipos de células, expresan VEGFR2 en su superficie (D'Amore 2007), siendo éste necesario para que VEGF ejerza sus funciones sobre ellos.

Wang y colaboradores demostraron que el genotipo CC del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 se asocia con un 68% de menor actividad transcripcional de dicho gen, lo que se traduce en niveles reducidos de la proteína VEGFR2 (Wang et al. 2007). Posteriormente, Kariz y colaboradores demostraron que el genotipo CC de este SNP se asocia con mayores niveles séricos de VEGFA, sugiriendo que este incremento podría ser consecuencia de una compensación por un déficit en la señalización VEGFA/VEGFR2 (Kariz et al. 2014).

Este SNP se ha estudiado fundamentalmente en el ámbito del riesgo cardiovascular. Se ha sugerido que podría constituir un factor de riesgo para sufrir un infarto de miocardio en población caucásica con diabetes mellitus tipo 2 (Kariz et al. 2014). Sin embargo, en otros estudios se asoció con una disminución de la susceptibilidad a sufrir un ictus aterotrombótico y con menor recurrencia de éste (Zhang et al. 2009), y con un riesgo disminuido de tener enfermedad coronaria (Wang et al. 2007). En estos dos últimos estudios, los autores sugieren que la disminución del riesgo podría estar mediada, al menos parcialmente, por la menor expresión de VEGFR2.

Nuestros datos muestran una asociación entre la presencia del alelo C del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 y la EOP (54,7% en los pacientes con EOP frente al 47,3% en los controles), así como una mayor presencia del genotipo CC al hacer el análisis por dominancias y por codominancia dominante, por lo que los datos son bastantes congruentes.

La explicación de estos datos sugiere varias hipótesis sobre el papel de esta variante genética a nivel óseo y a nivel endotelial. Este SNP, que se acompañaría de niveles más bajos de VEGFR2, induciría de forma compensatoria la producción de niveles más altos de VEGFA en estos pacientes.

Como ya se ha comentado, una importante fuente de VEGFA es la que se obtiene al degradar la ECM por parte de los osteoclastos, por lo que una posible hipótesis sería la de que, ante la necesidad de mayores niveles de VEGFA, los osteoclastos aumentaran su actividad metabólica con el fin de aumentar la resorción de ECM y liberar así el VEGFA secuestrado en la matriz ósea, colaborando de esta forma a aumentar los niveles de VEGFA.

Otra posible explicación sería la de que, al aumentar la producción de VEGFA, estos niveles aumentados favorecerían la diferenciación, maduración y actividad de los osteoclastos y osteoblastos, contribuyendo a crear un ambiente óptimo para un mayor remodelado óseo. Además, el osteoblasto y el osteoclasto, que son capaces de retroalimentarse por un mecanismo autocrino (no así las CEs), aumentarían aún más su actividad, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, se considera que la fuente principal de VEGF en la médula ósea son los osteoblastos, por lo que, ante la necesidad de mayores niveles de VEGFA, éstos podrían aumentar en número y supervivencia, y hacer que el número y la actividad de los octeoclastos también aumentara a través del propio VEGFA y de otros señalizadores producidos por los osteoblastos, como RANKL.

Por último, el que existan vasos específicos dentro de los sistemas de Havers del hueso adulto capaces de expresar VEGF y contribuir así a los niveles globales es una posibilidad sugerida por algunos autores (Clarkin et al. 2013). Ésto podría explicar el que proliferasen más estos vasos en la médula ósea del hueso, para contribuir así con la producción de VEGF y produciendo, como consecuencia, una mayor angiogénesis a nivel local y una mayor activación de osteoclastos y osteoblastos por el propio VEGF.

Por otro lado, que el SNP VEGFR2 rs2071559 se haya asociado con la aparición de eventos vasculares cerebrales y coronarios (Kariz et al. 2014; Zhang et al. 2009; Wang et al. 2007), los resultados de estudios previos de nuestro grupo (García-Aparicio et al. Universidad de Salamanca 2009), y los resultados de nuestro estudio, reabren el debate sobre si la EOP es o no un factor protector para que estos pacientes vivan más tiempo.

Nuestro grupo de trabajo objetivó que los pacientes con EOP de la cohorte estudiada tenían una supervivencia claramente mayor a la esperanza de vida estimada para la población general, y menor prevalencia de algunos factores de riesgo cardio-vascular como diabetes mellitus, hipertensión arterial y dislipemia que el resto de la población estudiada (García-Aparicio et al. Universidad de Salamanca 2009). En ese mismo trabajo, el genotipo CG del SNP P12A del gen PPAR-G, vinculado al descenso del riesgo cardio-vascular en varios estudios (Altshuler et al. 2000; Deeb et al. 1998; Ostgren et al. 2003; Temelkova-Kurktschiev et al. 2004), se asoció con padecer EOP, postulando que este SNP podría participar tanto en la patogenia de la enfermedad como en el aumento de la supervivencia observada en estos pacientes. Estos resultados apoyan a los de Wermers y colaboradores (Wermers et al. 2008), que describen una mayor supervivencia en pacientes con EOP, pero van en contra de los resultados objetivados por el trabajo de van Staa y colaboradores (van Staa et al. 2002).

Aunque los resultados de los estudios ya comentados que relacionan el SNP VEGFR2 rs2071559 con infarto de miocardio e ictus no son concluyentes en relación a la supervivencia, ya que en dos de ellos este SNP ejerce como un factor protector y en otro como un factor de riesgo de eventos vasculares, el que el genotipo CC se haya asociado con la EOP en nuestro trabajo nos hace pensar que, al igual que lo referido sobre el SNP P12A del gen PPAR-G, además de poder contribuir al desarrollo de la enfermedad, podría contribuir a que estos pacientes tuvieran un mayor o menor número de eventos vasculares, lo que conllevaría una mayor o menor supervivencia.

Por lo tanto, el seguimiento de esta cohorte de pacientes con EOP a lo largo del tiempo puede ayudar a decantar la balanza a favor o en contra de la teoría de que los pacientes con EOP tienen una mayor supervivencia.

Por último, en lo que al SNP VEGFR2 rs2071559 se refiere, nuestro estudio mostró que el genotipo TT se asoció a tener menos complicaciones tanto en el estudio por dominancias como por codominancia recesiva y por alelos. Lo mismo ocurre al analizar las complicaciones de lesión de par craneal y coxopatía por separado. Con la lesión de par craneal los resultados son muy consistentes. Con la presencia de coxopatía la asociación es menos clara, ya que la diferencia se establece sólo entre el genotipo TT y el TC, y no existen diferencias significativas al hacer el estudio por alelos. Estos datos podrían estar en relación con una mayor predisposición a tener afectación de huesos planos (cráneo y huesos de la pelvis), apoyando la hipótesis desarrollada cuando comentamos la asociación de los dos SNPs del gen VEGFA estudiados con la afectación del cráneo.

Sintetizando los resultados del estudio de este SNP, el ser portador del alelo C y genotipo CC del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 se asocia con padecer una EOP y con presentar complicaciones una vez que se desarrolla la enfermedad, por lo que parece que este SNP podría estar implicado en la patogénesis de esta enfermedad, al predisponer a ella y a hacer que ésta sea más sintomática. Igualmente, podría suponer una protección ante eventos cardiovasculares y que éstos pacientes vivieran más tiempo.

2.3 Gen ET1.

ET1 es la isoforma predominante y la más estudiada de la familia de las ETs y actúa como moduladora del tono vasomotor, la proliferación celular y la producción hormonal (Giannessi et al. 2001; Randall et al. 1989).

Existen experimentos realizados in vivo que apoyan la noción de que la ET1 promueve la formación de hueso (Nelson et al. 1999; Tsukahara et al. 1998; Yin et al. 2003). Además, dos estudios sugieren un papel importante de ET1 en la patogénesis de la EOP (Tarquini et al. 1998; Pirzer et al. 2005).

El SNP ET1 rs5370 supone el cambio de una G por una T en la posición 928 (exón 7) del gen ET1. Esto se traduce en el cambio de una lisina por un aspártico en la posición 198 de la proteína (LYs198Asn). Sin embargo, no está claro qué supone este cambio de aminoácido en la funcionalidad de esta proteína.

Este SNP se ha asociado a hipertensión arterial en pacientes con artritis reumatoide (Panoulas et al. 2008), como factor protector de la retinopatía diabética (Li et al. 2008) o como factor de riesgo de padecer cirrosis biliar primaria (Mantaka et al. 2012).

De todos los SNPs estudiados, el SNP rs5790 del gen ET1 es el único que parte con cierta evidencia en lo que a su relación con la EOP se refiere, ya que en dos estudios se relacionaron los niveles de ET1 con la EOP y con la actividad de ésta (Pirzer et al. 2005; Tarquini et al. 1998).

Aunque en nuestro estudio no encontramos diferencias entre los pacientes con EOP y los controles al analizar este SNP, los datos de nuestro trabajo muestran una asociación entre el genotipo TT del SNP ET1 rs5370 y las formas familiares de la enfermedad (14,9% frente al 2,8% en las esporádicas), apoyando estos resultados la teoría genética del desarrollo de la enfermedad y el probable papel de ET1 en el desarrollo de ésta. Sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra, sobre todo el escaso número de casos familiares, hace difícil dar validez a estos datos, pudiendo ser esta asociación debida al azar.

Como se ha comentado, se piensa que el aumento de los niveles de ET1 en pacientes con EOP frente a controles podría deberse a la producción de ET1 por parte de los osteoblastos en un intento de “frenar” a los osteoclastos (Tarquini et al. 1998). Además, parece que el efecto de ET1 sobre los osteoclastos es fundamentalmente inhibidor (Alam et al. 1992). Por lo tanto, menores niveles de ET1, o una proteína hipofuncionante, podrían dificultar la inhibición de los osteoclastos por parte de los osteoblastos.

De confirmarse nuestra asociación con estudios con una mayor muestra y extrapolando nuestros resultados con los obtenidos en los dos estudios ya comentados, una hipótesis sería la de que este SNP podría traducirse en la

síntesis de una proteína hipofuncionante, dificultando la inhibición de los osteoclastos y favorecer la progresión de la enfermedad y causar además una enfermedad más agresiva, característica de los casos de EOP familiar.

En lo que a la historia natural de la EOP se refiere, tal y como hemos comentado ya antes, en nuestra serie, el genotipo TT de este mismo SNP se asoció con presentar una enfermedad inactiva en el momento de ser diagnosticado de EOP, lo que podría traducir el que este SNP estuviera relacionado de algún modo con un fenotipo en el que la EOP se desarrollase a una edad más temprana o bien que se desarrollase a la misma edad que los portadores de los otros genotipos pero que tuvieran lesiones con una fase activa más reducida en intensidad y/o tiempo que explicara el retraso en su diagnóstico por menores síntomas o alteraciones de laboratorio. Sin embargo, lo más probable es que este resultado sea un hallazgo casual, ya que el momento del diagnóstico de la EOP suele ser fortuito.

2.4 Gen eNOS.

NO está implicado en distintas funciones a nivel del sistema cardiovascular (Palmer et al. 1987; Prast et al. 2001; Ignarro 2002; Radomski et al. 1987), sistema nervioso central (Jaffrey et al. 1995; Paakkari et al. 1995) y sistema inmunológico (Wei et al. 1995; Nathan et al. 1991; Saura et al. 1999), entre otros. Los efectos de NO sobre el remodelado óseo se ejercen de forma general por la activación de mediadores locales y segundos mensajeros presentes en las células óseas, existiendo una clara evidencia sobre la implicación de NO en el desarrollo del hueso, la curación del hueso y la resorción ósea (Collin-Osdoby et al. 1995; van't Hof et al 2001), además de ser clave en la progresión de enfermedades óseas inflamatorias (Armour et al. 2001).

eNOS se expresa ampliamente en las células del estroma de la médula ósea, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Fox et al. 1998; Helfrich et al. 1997; Saura et al. 2010). Además, estudios recientes apuntan que eNOS

puede ser la principal fuente de NO en la regulación de la resorción ósea (Rubin et al. 2003).

La variante genética que hemos estudiado, el SNP eNOS rs2070744, está relacionada con la expresión de NO. Al estar localizado este SNP en la región promotora del gen eNOS, éste está relacionado con los niveles de mRNA y, probablemente, de NO. Metzger y colaboradores demostraron que variantes genéticas de eNOS combinadas dentro de un haplotipo específico modulan la síntesis de NO, aunque afirman que probablemente los SNPs individuales de eNOS no tengan grandes efectos en la producción de NO (Metzger et al. 2007).

Este SNP se ha estudiado fundamentalmente como marcador de riesgo cardiovascular (Lee et al. 2006; Rossi et al. 2006), pero también se ha asociado con enfermedades inflamatorias como psoriasis (Coto-Segura et al. 2011), o artritis reumatoide (Melchers et al. 2006), y con algunas neoplasias, ya que se demostró que este SNP tiene papel protector ante el cáncer de mama (Yao et al. 2010) y, por otro lado, se asoció a la progresión de cáncer de próstata (Marangoni et al. 2008).

Al hacer el estudio de este SNP, no encontramos relación entre éste y padecer EOP, ni tampoco en padecer una enfermedad familiar o esporádica. En cuanto al fenotipo de la enfermedad, en nuestro estudio hemos observado que ser portador del alelo C del SNP rs2070744 del gen eNOS se asocia con presentar una enfermedad activa en el momento del diagnóstico, observándose una tendencia similar cercana a la significación estadística en el estudio de codominancia dominante.

Esto podría traducir una enfermedad más sintomática que hiciera al paciente consultar antes a su médico, encontrándose así todavía en la fase activa en el momento del diagnóstico. Como ya se ha comentado previamente, el diagnóstico de la EOP suele realizarse de forma fortuita, por lo que el momento en el que se realiza el diagnóstico puede ser en la mayor parte de los casos fruto del azar.

Sin embargo, quizás habría que analizar esta cuestión más profundamente. En nuestro estudio, tres de los SNPs estudiados se han relacionado con el momento en el que se diagnostica la EOP. En principio otorgamos poco valor a estos resultados por lo anteriormente comentado, pero quizás los SNPs de estos genes implicados en la angiogénesis influyan realmente en el fenotipo de ésa enfermedad en lo que a la fase de actividad y edad de desarrollo de la enfermedad se refiere.

Por último, en los últimos años se han incrementado los conocimientos en la osteoinmunología, mediante la que sabemos el papel que juega el sistema inmunológico en la regulación de la activación del osteoclasto. Este aspecto no es bien conocido en la EOP. El SNP eNOS rs2070744 se ha asociado con algunas enfermedades inflamatorias como psoriasis o AR. Aunque no existe confirmación experimental, este SNP podría, de algún modo, facilitar un aumento de las citocinas proinflamatorias mediadoras de la lesión de la enfermedad inflamatoria. Se conoce que este aumento de las citocinas es, a su vez, un activador de la actividad osteoclástica y facilita la lesión pagética ósea. Sin embargo, dado que eNOS está más implicado en la producción de NO “fisiológica”, quizás su alteración en el hueso en enfermedades inflamatorias (en las que iNOS es la protagonista) y, quizás también, en la EOP, no tenga tanto protagonismo. Sería interesante estudiar, por lo tanto, los SNPs de iNOS en un futuro.

3 Áreas de aplicación y directrices para futuras investigaciones

Nuestro estudio aporta datos de una posible asociación entre la EOP y algunas variantes de los principales genes que regulan la angiogénesis. La EOP tiene una base genética, habiéndose descrito la participación de diversas variantes relacionadas principalmente con la actividad del osteoclasto. También se conoce la importancia de la angiogénesis en la biología ósea y, probablemente, también la tenga en la patogenia de la EOP. Esta participación podría estar relacionada con algunas características del fenotipo de la enfermedad, especialmente relacionadas con el momento y modo de presentación. Estos resultados son preliminares, realizados en una cohorte concreta, y precisan de confirmación en otros grupos de pacientes con EOP.

Habrá que profundizar en el significado biológico de estas alteraciones. Si se confirmara el papel de la angiogénesis en la patogenia de la EOP, sus componentes moleculares podrían ser futuras dianas terapéuticas. En este sentido, se ha demostrado la utilidad del tratamiento anti-VEGFA en enfermedades oncológicas en las que la angiogénesis juega un papel importante. De este modo podría disponerse de una alternativa terapeútica a los BSFs tanto en los pacientes con EOP activa como en aquellos que precisen cirugía urgente de las lesiones óseas.

Por otro lado, coincidiendo con lo que sugiere Albagha y colaboradores (Albagha et al. 2013), la posibilidad de identificar a hijos o nietos de pacientes con EOP portadores de SNPs que predisponen a EOP (posiblemente el SNP rs2071559 del gen VEGFR2 entre ellos) podría, en un futuro, abrir las puertas a un tratamiento “preventivo” antes de que se desarrolle la enfermedad, dada la buena tolerancia y respuesta de ZOL. Los resultados que arroje el estudio ZIPP , que analiza los riesgos y beneficios del uso profiláctico de ZOL en pacientes con la mutación de SQSTM1 que no han sido diagnosticados de EOP todavía, marcarán probablemente el camino a seguir en este apartado.

Además, el conocer que pacientes pueden presentar una peor respuesta al tratamiento con BSFs según su base genética nos ayudaría a poder

individualizar aún más el tratamiento de la EOP. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo encontraron una asociación entre el genotipo CC del SNP rs16944 del gen IL1β y la resistencia al tratamiento con BSFs en pacientes con EOP (Corral-Gudino et al. 2006). Dado que los BSFs tienen importantes propiedades antiangiogénicas (Hamma-Kourbali et al. 2002), el análisis a largo plazo de nuestra cohorte y la evolución de los pacientes tratados con ZOL podría colaborar con este propósito.

Por último, habría que valorar la relación de estos SNPs con el perfil cardiovascular de este tipo de pacientes, a la vista de los resultados obtenidos. Eso conllevaría el hacer un exhaustivo análisis de los factores de riesgo cardiovascular de estos pacientes y el análisis de la morbilidad y mortalidad, fundamentalmente por eventos vasculares.

4 Limitaciones del estudio.

La validez y fiabilidad de estos datos pudieran estar limitadas por un sesgo en la selección de la muestra. En este sentido, todos los pacientes incluidos en el estudio proceden bien de la consulta externa de enfermedad metabólica ósea, bien de los ingresados en el Hospital Universitario de Salamanca. Por ello, podría argumentarse que ésta no es una muestra representativa del total de los pacientes, ya que incluye sólo a los más graves que precisaron acudir a la consulta especializada y, de este modo, pudo haberse excluido a pacientes no diagnosticados u oligosintomáticos que no han sido referidos a atención especializada.

Por otro lado, sería necesario replicar estos resultados en otras series de pacientes para corroborarlos.

En cuanto a los genes estudiados, nuestro estudio se ha limitado al estudio de los genes de VEGFA, VEGFR2, ET1 y eNOS, como principales protagonistas en el proceso de la angiogénesis. Sin embargo, otros genes candidatos de análisis en este sentido serían los de iNOS, VEGFR1, endoglina y PGF, entre otros.

También sería muy interesante poder valorar mediante estudios funcionales las consecuencias biológicas de estas variantes genéticas en la EOP. Y sería más interesante aún comprobar si existe variación de los niveles de estas moléculas, y en qué sentido, en las distintas fases de la enfermedad o tras el inicio de tratamiento con ZOL.

CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados muestran que los pacientes con EOP procedentes de nuestra cohorte de Salamanca tienen características epidemiológicas y clínicas similares a las ya descritas en otras poblaciones de pacientes.

2. Nuestro estudio refleja por primera vez que el SNP rs2071559 del gen VEGFR2 está asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar EOP y sus complicaciones, lo que sugiere la probable implicación de factores vasculares en el desarrollo de la enfermedad.

3. El SNP rs 3070 del gen ET1 estudiado se relaciona con el desarrollo de EOP familiar en nuestra cohorte, lo que apoya la predisposición genética de esta enfermedad.

4. Existe una asociación entre los SNPs rs699947 y rs833061 del gen VEGFA, rs 2071559 del gen VEGFR2 ,rs5370 del gen ET1 y rs2070744 del gen eNOS con el fenotipo de la EOP, en relación con la afectación de determinados huesos y con la historia natural de esta enfermedad, por lo que asumimos que ciertos rasgos clínicos de la enfermedad podrían tener también una base genética relacionada con cambios que afectan a los vasos.

1. Our results show that PDB patients from our cohort of Salamanca present similar epidemiological characteristics as those described in other populations.

2. Our study shows for the first time that variant rs2071559 in VEGFR2 gene is associated with an increased susceptibility to develop PDB and its complications, which reinforces the importance of the involvement of vascular factors in the development of the disease.

3. Rs3070 within ET1 gene is related to the development of familial PDB in our cohort, supporting a genetic predisposition to the disease.

4. There is an association of rs699947 and rs833061 within VEGFA gene, rs2071559 in VEGFR2 gene, rs5370 in ET1 gene and rs2070744 within eNOS gene with the PDB phenotype, in relation to the involvement of certain bones and the natural history of this disease, so, we assume that certain features of the disease may also have a genetic basis related to changes that affect angiogenesis.

Bibliografía

Afzal F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. J Pathol 2004 Apr;202(4):503-10.

Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez DM, I, Hukkanen M, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene-Deficient Mice Demonstrate Marked Retardation in Postnatal Bone Formation, Reduced Bone Volume, and Defects in Osteoblast Maturation and Activity. Am J Pathol 2001 Jan;158(1):247-57.

Alam AS, Gallagher A, Shankar V, Ghatei MA, Datta HK, Huang CL, et al. Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. Endocrinology 1992;130:3617-24.

Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. Nat Genet 2010 Jun;42(6):520-4.

Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Wani S, Goodman K, Fraser WD, et al. Common susceptibility alleles and SQSTM1 mutations predict disease extent and severity in a multinational study of patients with Paget's disease. J Bone Miner Res 2013 Nov;28(11):2338-46.

Al-Habboubi HH, Sater MS, Almawi AW, Al-Khateeb GM, Almawi WY. Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population. Eur Cytokine Netw 2011;2(3);154-158.

Alonso V, de Gortazar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. J Cell Physiol 2008 Dec;217(3):717-27.

Altman RD. Musculoskeletal manifestations of Paget's disease of bone. Arth Rheum 1980;23:1121-7.

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Nat Genet 2000 Sep;26(1):76-80.

Arbeloya Rodríguez L, Pérez Ledo L. Manual de enfermedades óseas. Panamericana. 2010.

Arboleya L, Castaneda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. Reumatol Clin 2013 Sep;9(5):303-15.

Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Godecke A, Helfrich MH, Reid DM, et al. Defective bone formation and anabolic responses to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide sythase. Endocrinology 2001 Feb;142(2):760-6.

Baldik Y, Diwan AD, Appleyard RC, Fang ZM, Wang Y, Murrell GA. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. Bone 2005 Jul;37(1):32-6.

Barker DJ, Chamberlain AT, Guyer PB, Gardner MJ. Paget's disease of bone: the Lancashire focus. Br Med J 1980;280(6222):1105-7.

Bolland MJ, Cundy T. Paget's disease of bone: clinical review and update. J Clin Pathol 2013 Nov;66(11):924-7.

Bone HG. Nonmalignant complications of Paget's disease. J Bone Miner Res 2006 Dec;21 Suppl 2:64-8.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. J Bone Miner Res 2011 Feb;26(2):229-38.

Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. J Bone Miner Res 2006 Feb;21(2):183-92.

Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Mar 28;92(7):2954-8.

Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, et al. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. Bone 1987;8(3):157-64.

Buttery LD, Aguirre IJ, Hukkanen MV, Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Huang PL, et al. Nitric Oxide Stimulates Osteoblast Replication and Development. Journal of Bone & Mineral Research 14 (supplement), 1154-(abstract). 1999.

Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, et al. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. Blood 2010 Jan 7;115(1):140-9.

Calabrese EJ. Nitric oxide: biphasic dose responses. Crit Rev Toxicol 2001 Jul;31(4-5):489-501.

Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov Today 2003 Nov 1;8(21):980-9.

Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. J Pharm Pharmacol 1997 Sep;49(9):897-902.

Chang CC, Liao, YS, Lin YL, Chen RM. Nitric oxide protects osteoblasts from oxidative stress-induced apoptotic insults via a mitochondria-dependent mechanism. J Orthop Res 2006 Nov;24(10):1917-25.

Cheung WY, Liu C, Tonelli-Zasarsky RM, Simmons CA, You L. Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro. J Orthop Res 2011 Apr;29(4):523-30.

Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. Cytokine Growth Factor Rev 2013 Jun;24(3):297-310.

Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? Cell Biochem Funct 2013 Jan;31(1):1-11.

Clines GA, Mohammad KS, Grunda JM, Clines KL, Niewolna M, McKenna CR, et al. Regulation of postnatal trabecular bone formation by the osteoblast endothelin A receptor. J Bone Miner Res 2011 Oct;26(10):2523-36.

Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. Bone cell function, regulation and communication: a role for nitric oxide. J Cell Biochem 1995;57:399-408.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. J Bone Miner Res 2000 Mar;15(3):474-88.

Cooper C, Schafheutle K, Dennison E, Kellingray S, Guyer P, Barker D. The epidemiology of Paget's disease in Britain: is the prevalence decreasing? J Bone Miner Res 1999 Feb;14(2):192-7.

Corral-Gudino L, Borao-Cengotita-Bengoa M, Del Pino-Montes J, Ralston S. Epidemiology of Paget's disease of bone: a systematic review and meta-analysis of secular changes. Bone 2013 Aug;55(2):347-52.

Corral-Gudino L, del Pino-Montes J, Garcia-Aparicio J, Corral E, Montilla CA, Gonzalez-Sarmiento R. -511 C/T IL1B gene polymorphism is associated to resistance to bisphosphonates treatment in Paget disease of bone. Bone 2006 Apr;38(4):589-94.

Corral-Gudino L, Garcia-Aparicio J, Sanchez-Gonzalez MD, Miron-Canelo JA, Blanco JF, Ralston SH, et al. Secular changes in Paget's disease: contrasting changes in the number of new referrals and in disease severity in two neighboring regions of Spain. Osteoporosis Int 2013 Feb;24(2):443-50.

Costa N, Paramanathan S, Mac DD, Wierzbicki AS, Hampson G. Factors regulating circulating vascular endothelial growth factor (VEGF): association with bone mineral density (BMD) in post-menopausal osteoporosis. Cytokine 2009 Jun;46(3):376-81.

Coto-Segura P, Coto E, Mas-Vidal A, Morales B, Alvarez V, Diaz M, Alonso B, Santos-Juanes J. Influence of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in psoriasis risk. Arch Dermatol Res 2011 Oct;303(6):445-9.

Couffinhal T, Kearney M, Witzenbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. Am J Pathol 1997 May;150(5):1673-85.

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci 2003 Sep;28(9):488-94.

Dahniya MH. Paget's disease of bone in Africans. Br J Radiol 1987 Feb;60(710):113-6.

D'Amore PA. Vascular endothelial cell growth factor-a: not just for endothelial cells anymore. Am J Pathol 2007 Jul;171(1):14-8.

Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. J Bone Miner Res 1997 Mar;12(3):412-22.

Daroszewska A, van 't Hof RJ, Rojas JA, Layfield R, Landao-Basonga E, Rose L, et al. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSMT1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. Hum Mol Genet 2011 Jul 15;20(14):2734-44.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol 2008 May;61(5):577-87.

Davie M, Davies M, Francis R, Fraser W, Hosking D, Tansley R. Paget's disease of bone: a review of 889 patients. Bone 1999 May;24(5 Suppl):11S-2S.

De Cathertina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest 1995 Jul;96(1):60-8.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 1992 Feb 21;255(5047):989-91.

Deckers MM, Karperien M, Van der BC, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. Endocrinology 2000 May;141(5):1667-74.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nat Genet 1998 Nov;20(3):284-7.

Del Pino Montes J, Corral Gudino L, Sánchez MD, Calero I, Carranco TE, Quesada Moreno A. Enfermedad ósea de Paget, osteomalacia y sarcopenia. Medicine 2014 Jun;11(60):3555-66.

Del Pino Montes J, González M, Pérez Tabernero MJ, Benito J, Arias M, De Diego JM. Enfermedad ósea de Paget: Prevalencia y asociación a antígenos HLA en una zona de Castilla-León. An Med Int (Madrid) 1986;3(3):45.

Del Pino-Montes J, Garcia de Yebenes Prous MA, Torrijos EA, Morales PA, Carbonell AJ, Farrerons MJ, et al. [Characteristics of Paget's disease in Spain. Data from the National Paget's Register]. Reumatol Clin 2009 May;5(3):109-14.

Del Pino-Montes J. La enfermedad de Paget: la historia interminable. Reumatol Clin 2007;3(1):13-5.

De la Paz NG, D'Amore PA. Arterial versus venous endothelial cells. Cell Tissue Res 2009 Jan;335(1):5-16.

Devogelaer JP, Bergmann P, Body JJ, Boutsen Y, Goemaere S, Kaufman JM, et al. Management of patients with Paget's disease: a consensus document of the Belgian Bone Club. Osteoporos Int 2008 Aug;19(8):1109-17.

Dilling CF, Wada AM, Lazard ZW, Salisbury EA, Gannon FH, Vadakkan TJ, et al. Vessel formation is induced prior to the appearance of cartilage in BMP-2-mediated heterotopic ossification. J Bone Miner Res 2010 May;25(5):1147-56.

Ding WG, Wei ZX, Liu JB. Reduced local blood supply to the tibial metaphysis is associated with ovariectomy-induced osteoporosis in mice. Connect Tissue Res 2011 Feb;52(1):25-9.

Douglas DL, Duckworth T, Kanis JA, Jefferson AA, Martin TJ, Russell RG. Spinal cord dysfunction in Paget's disease of bone. Has medical treatment a vascular basis? J Bone Joint Surg Br 1981;63B(4):495-503.

Dupuis J, Hoeper MM. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J 2008 Feb;31(2):407-15.

Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, et al. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. Hypertension 1991 Aug;18(2):165-70.

Eretto P, Krohel GB, Shihab ZM, Wallach S, Hay P. Optic neuropathy in Paget's disease. Am J Ophthalmol 1984 Apr;97(4):505-10.

Eshkar-Oren I, Viukov SV, Salameh S, Krief S, Oh CD, Akiyama H, et al. The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of Vegf. Development 2009 Apr;136(8):1263-72.

Feelisch, M. & Stamier, J.S. Methods in Nitric Oxide Research. Chichester, J. Viley & Sons. 1996.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003 Jun;9(6):669-76.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev 2004 Aug;25(4):581-611.

Formigli L, Orlandini SZ, Benvenuti S, Masi L, Pinto A, Gattei V, et al. In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone

endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. J Cell Physiol 1995;162:199-212.

Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. Bone 1998 Jul;23(1):1-6.

Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S, Yokoyama K, Fujibayashi M, Orita Y, et al. Stimulatory effect of thrombin on endothelin-1 production in isolated glomeruli and cultured mesangial cells of rats. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17 Suppl 7:S411-S413.

García-Aparicio J. Valoración del riesgo cardiovascular en los pacientes con enfermedad ósea de Paget (EOP) en Salamanca. [Tesis doctoral]. Salamanca. Universidad de Salamanca. 2009.

Geetha T, Wooten MW. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. FEBS Lett 2002 Feb 13;512(1-3):19-24.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation [see comments]. Nat Med 1999 Jun;5(6):623-8.

Giannessi D, Del RS, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. Pharmacol Res 2001 Feb;43(2):111-26.

Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. Endocrinology 1996 Jun;137(6):2262-8.

Guma M, Rotes D, Holgado S, Monfort J, Olive A, Carbonell J, et al. [Paget's disease of bone: study of 314 patients]. Med Clin (Barc) 2002 Oct 26;119(14):537-40.

Guyer PB, Chamberlain AT. Pagets-Disease of Bone in 2 American-Cities. Br Med J 1980;280(6219):985.

Hadjipavlou A, Lander P, Srolovitz H. Pagetic arthritis. Pathophysiology and management. Clin Orthop Relat Res 1986 Jul;(208):15-9.

Hamlat A, Adn M, Pasqualini E, Brassier G, Askar B. Pathophysiology of capillary haemangioma growth after birth. Med Hypotheses 2005;64(6):1093-6.

Hamma-Kourbali Y, Di BM, Ledoux D, Oudar O, Leroux Y, Lecouvey M, et al. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun 2003 Oct 24;310(3):816-23.

Hansen MF, Seton M, Merchant A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. J Bone Miner Res 2006 Dec;21:58-63.

Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. J Clin Invest 1994 Jun;93(6):2490-6.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 2003 May 15;423(6937):349-55.

Hattori R, Sase K, Eizawa H, Kosuga K, Aoyama T, Inoue R, et al. Structure and function of nitric oxide synthases. Int J Cardiol 1994 Dec;47(1 Suppl):S71-S75.

Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, et al. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor- mediated system. Biochemical & Biophysical Research Communications 1995;214(3):847-55.

Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. J Bone Miner Res 1997 Jul;12(7):1108-15.

Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, et al. A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultrastructural studies in UK patients. J Bone Miner Res 2000 Dec;15(12):2315-29.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005 Feb 10;23(5):1011-27.

Ho WP, Chen TL, Chiu WT, Tai YT, Chen RM. Nitric oxide induces osteoblast apoptosis through a mitochondria-dependent pathway. Ann N Y Acad Sci 2005 May;1042:460-70.

Hocking LJ, Lucas GJ, Daroszewska A, Cundy T, Nicholson GC, Donath J, et al. Novel UBA domain mutations of SQSTM1 in Paget's disease of bone: genotype phenotype correlation, functional analysis, and structural consequences. J Bone Miner Res 2004 Jul;19(7):1122-7.

Hocking LJ, Mellis DJ, McCabe PS, Helfrich MH, Rogers MJ. Functional interaction between sequestosome-1/p62 and autophagy-linked FYVE-containing protein WDFY3 in human osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 2010 Nov 19;402(3):543-8.

Holdaway IM, Ibbertson HK, Wattie D, Scragg R, Graham P. Previous pet ownership and Paget's disease. Bone Miner 1990;8(1):53-8.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J Physiol Pharmacol 2002 Dec;53(4 Pt 1):503-14.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Apr;86(8):2863-7.

Jaasma MJ, Jackson WM, Tang RY, Keaveny TM. Adaptation of cellular mechanical behavior to mechanical loading for osteoblastic cells. J Biomech 2007;40(9):1938-45.

Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: a neural messenger. Annu Rev Cell Dev Biol 1995;11:417-40.

Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and

prognostic markers for major solid tumors. Mol Cancer Ther 2009 Jun;8(9):2496-2508.

Jung JY, Lin AC, Ramos LM, Faddis BT, Chole RA. Nitric oxide synthase I mediates osteoclast activity in vitro and in vivo. J Cell Biochem 2003 Jun1;89(3):613-21.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Apr 11;92(8):3566-70.

Kanaoka K, Kobayashi Y, Hashimoto F, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, et al. A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. Endocrinology 2000 Aug;141(8):2995-3005.

Kariz S, Petrovic D. Minor association of kinase insert domain-containing receptor gene polymorphism (rs2071559) with myocardial infarction in Caucasians with type 2 diabetes mellitus: case-control cross-sectional study. Clin Biochem 2014 May;47(16-17):192-6.

Kasperk CH, Borcsok I, Schairer HU, Schneider U, Nawroth PP, Niethard FU, et al. Endothelin-1 is a potent regulator of human bone cell metabolism in vitro. Calcif Tissue Int 1997 Apr;60(4):368-74.

Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. Cell Mol Life Sci 2011 Jan;68(2):195-203.

Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:851-76.

Kitten AM, Andrews CJ. Endothelin-1 expression in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts: regulation by BMP-7. J Cell Physiol 2001 May;187(2):218-25.

Kogianni G, Noble BS. The biology of osteocytes. Curr Osteoporos Rep 2007 Jun;5(2):81-6.

Kozawa O, Kawamura H, Hatakeyama D, Matsuno H, Uematsu T. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. Cell Signal 2000 Jun;12(6):375-80.

Lam HC, Lee JK, Lai KH. Detection and characterization of endothelin in transformed human osteoblast cell culture medium. Endocrine 2000 Feb;12(1):77-80.

Layfield R, Ciani B, Ralston SH, Hocking LJ, Sheppard PW, Searle MS, et al. Structural and functional studies of mutations affecting the UBA domain of SQSTM1 (p62) which cause Paget's disease of bone. Biochem Soc Trans 2004 Nov;32(Pt 5):728-30.

Layfield R, Hocking LJ. SQSTM1 and Paget's disease of bone. Calcif Tissue Int 2004 Nov;75(5):347-57.

Lee CR, North KE, Bray MS, Avery CL, Mosher MJ, Couper DJ, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E, Heiss G, Zeldin DC. NOS3 polymorphisms, cigarette smoking, and cardiovascular disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities study. Pharmacogenet Genomics 2006 Apr;16(12):891-9.

Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. Cell 2007 Aug 24;130(4):691-703.

Lever JH. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: a speculative hypothesis. Bone 2002 Sep;31(3):434-6.

Li H, Louey JW, Choy KW, Liu DT, Chan WM, Chan YM, Fung NS, Fan BJ, Baum L, Chan JC, Lam DS, Pang CP EDN1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. Mol Vis 2008 Jun;14:1698-1704.

Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Lee MS, Wang CC, Lan WH, et al. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. J Bone Miner Res 2003 Jan;18(1):39-46.

Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. J Clin Invest 2012 Sep 4;122(9):3101-13.

Liu Y, Olsen BR. Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2014 Oct;62(5):363-8.

Lojo-Oliveira L, Torrijos-Eslava A. Tratamiento de la enfermedad ósea de Paget. Reumatol Clin 2012 Jan;8(4):220-4.

Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS. Effect of age on vascularization during fracture repair. J Orthop Res 2008 Oct;26(10):1384-9.

Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. J Orthop Res 2007 Jan;25(1):51-61.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Int J Biochem Cell Biol 2008;40(1):46-62.

Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. Dev Cell 2010 Aug 17;19(2):329-44.

Maharaj AS, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. Microvasc Res 2007 Sep;74(2-3):100-13.

Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. Am J Pathol 2006 Feb;168(2):639-48.

Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martineti V, MacIntyre I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. Biochem Biophys Res Commun 2000 Aug 2;274(2):477-81.

Mantaka A, Goulielmos GN, Koulentaki M, Tsagournis O, Voumvouraki A, Kouroumalis EA. Polymorphisms of genes related to endothelial cells are

associated with primary biliary cirrhosis patients of Cretan origin. Hum Immunol 2012 Feb;73(8):829-35.

Marangoni K, Araujo TG, Neves AF, Goulart LR. The -786T>C promoter polymorphism of the NOS3 gene is associated with prostate cancer progression. BMC Cancer 2008 Sep;8:273.

Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. Bone 2002 Mar;30(3):472-7.

Melchers I, Blaschke S, Hecker M, Cattaruzza M. The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006 Mar;54(10):3144-51.

McCloskey, E.V. 2002. Neurological complications of Paget´s disease. Clin Rev Bone Miner Metab., 1, 135-143.

Melton LJ, III, Tiegs RD, Atkinson EJ, O'Fallon WM. Fracture risk among patients with Paget's disease: a population-based cohort study. J Bone Miner Res 2000 Nov;15(11):2123-8.

Mentaverri R, Kamel S, Wattel A, Prouillet C, Sevenet N, Petit JP, et al. Regulation of bone resorption and osteoclast survival by nitric oxide: possible involvement of NMDA-receptor. J Cell Biochem 2003 Apr 15;88(6):1145-56.

Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. Free Radic Biol Med 2007;43(6):987-992.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. Curr Biol 1999 Jul 29;9(15):845-8.

Michou L, Collet C, Laplanche JL, Orcel P, Cornelis F. Genetics of Paget's disease of bone. Joint Bone Spine 2006 May;73(3):243-8.

Midy V, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 1994 Feb 28;199(1):380-6.

Min JK, Kim YM, Kim YM, Kim EC, Gho YS, Kang IJ, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. J Biol Chem 2003 Oct 10;278(41):39548-57.

Miron-Canelo JA, del Pino-Montes J, Vicente-Arroyo M, Saenz-Gonzalez MC. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). The Paget's disease of the bone study group of Salamanca. Eur J Epidemiol 1997 Oct;13(7):801-5.

Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. Acta Physiol Scand 1992;145:201-27.

Monsell EM, Bone HG, Cody DD, Jacobson GP, Newman CW, Patel SC, et al. Hearing loss in Paget's disease of bone: evidence of auditory nerve integrity. American Journal of Otology 1995;16(1):27-33.

Morales PA, Elena IA, Hernandez Collados MA, Calabozo RM, Medina LJ, Sanchez SM. [The immunoglobulin profile in Paget's disease of bone]. Rev Clin Esp 1988 Jun;183(2):71-3.

Morales PA, Lopez-Abente G, Garcia VA, Ibanez AE, Gonzalez-Lanza M. [Features of Paget's disease of bone in a new high-prevalence focus]. Med Clin (Barc) 1990 Jun 30;95(5):169-74.

Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS Lett 2000 May 12;473(2):161-4.

Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. J Biol Chem 1995 Dec 29;270(52):31189-95.

Nathan CF, Hibbs JBJ. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol 1991;3:65-70.

Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon DB, Chung LW, et al. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. Urology 1999 May;53(5):1063-9.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999 Jan;13(1):9-22.

Niedzwiedzki T, Filipowska J. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. J Mol Endocrinol 2015 Oct;55(2):R23-R36.

Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony- stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med 1999 Jul 19;190(2):293-8.

Nilforoushan D, Gramoun A, Glogauer M, Manolson MF. Nitric oxide enhances osteoclastogenesis possibly by mediating cell fusion. Nitric Oxide 2009 Aug;21(1):27-36.

Ostgren CJ, Lindblad U, Melander O, Melander A, Groop L, Rastam L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gammaPro12Ala polymorphism and the association with blood pressure in type 2 diabetes: skaraborg hypertension and diabetes project. J Hypertens 2003 Sep;21(9):1657-62.

Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. Ann Med 1995 Jun;27(3):369-77.

Paget J. Additional Cases of Osteitis Deformans. Med Chir Trans 1882;65:225-36.

Paget J. On a form of chronic inflammation of bones (Osteitis Deformans). Medico-Chir Trans 1876;ix:37-63.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327(6122):524-6.

Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, Taffe P, Stavropoulos-Kalinoglou A, Toms TE, Elisaf MS, Nightingale P, Kitas GD. Polymorphisms of the endothelin-1 gene associate with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. Endothelium 2008 Dec;15(4):203-12.

Parvizi J, Klein GR, Sim FH. Surgical management of Paget's disease of bone. J Bone Miner Res 2006 Dec;21 Suppl 2:75-82.

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. J Bone Miner Res 2005 Nov;20(11):2017-27.

Percival MD, Ouellet M, Campagnolo C, Claveau D, Li C. Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. Biochem 1999 Oct 12;38(41):13574-83.

Pirzer R, Tilly N, Sommer U, Liegibel U, Grafe I, Nawroth P, et al. Endothelin-1 levels in patients with Paget's disease of bone. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2005 Dec;113(10):598-601.

Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Prog Neurobiol 2001 May;64(1):51-68.

Prisby R, Guignandon A, Vanden Bossche A, Mac-Way F, Linossier MT, Thomas M, et al. Intermittent PTH(1-84) is osteoanabolic but not osteoangiogenic and relocates bone marrow blood vessels closer to bone-forming sites. J Bone Miner Res 2011 Nov;26(11):2583-96.

Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, Varoga D, Drescher W, Franke AT, et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Gottingen miniature pigs and human osteoblasts. Calcif Tissue Int 2007 Mar;80(3):184-91.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet 1987;2(8567):1057-8.

Ralston SH, Grabowski PS. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: Role of Nitric Oxide, cyclic guanosine monophosphate and Prostaglandins. Bone 1996;19:29-33.

Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. J Bone Miner Res 1995 Jul;10(7):1040-9.

Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. Lancet 2008 Jul 12;372(9633):155-63.

Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget disease of bone. Calcif Tissue Int 2012 Aug;91(2):97-113.

Ralston SH. Clinical practice. Paget's disease of bone. N Engl J Med 2013 Feb 14;368(7):644-50.

Randall MD, Douglas SA, Hiley CR. Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. Br J Pharmacol 1989 Oct;98(2):685-99.

Reasbeck JC, Goulding A, Campbell DR, Beale LR, Stewart RD. Radiological prevalence of Paget's disease in Dunedin, New Zealand. Br Med J (Clin Res Ed) 1983 Jun 18;286(6382):1937.

Rebel A, Basle M, Pouplard A, Kouyoumdjian S, Filmon R, Lepatezour A. Viral antigens in osteoclasts from Paget's disease of bone. Lancet 1980 Aug 16;2(8190):344-6.

Rebel A, Malkani K, Basle M. [Nuclear anomalies in osteoclasts in Paget's bone disease]. Nouv Presse Med 1974 May 18;3(20):1299-301.

Reddy SV. Etiology of Paget's disease and osteoclast abnormalities. J Cell Biochem 2004 Nov 1;93(4):688-96.

Reid IR, Lyles K, Su G, Brown JP, Walsh JP, Del Pino-Montes J, et al. A single infusion of zoledronic acid produces sustained remissions in Paget disease: data to 6.5 years. J Bone Miner Res 2011 Sep;26(9):2261-70.

Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. N Engl J Med 2005 Sep 1;353(9):898-908.

Renier JC, Cronier P, Audran M. A new anatomic index based on current knowledge for calculating the cumulative percentage of pagetic bone per subject and other parameters. Rev Rhum Engl Ed 1995 May;62(5):355-8.

Renier JC, Bontoux-Carré E, Seret P, Villayleck C. l'activité de a maladie de Paget et quels malades traiter? Rev Rhum 1984 51;463-8.

Riancho JA, Delgado-Calle J. [Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms]. Reumatol Clin 2011 Sep;7 Suppl 2:S1-S4.

Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez-Luna JL, et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1995 Mar;10(3):439-46.

Rossi GP, Maiolino G, Zanchetta M, Sticchi D, Pedon L, Cesari M, Montemurro, De TR, Zavattiero S, Pessina AC. The T(-786)C endothelial nitric oxide synthase genotype predicts cardiovascular mortality in high-risk patients. J Am Coll Cardiol 2006 Jun;48(6)1166-74.

Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. Nature 2001 Aug 9;412(6847):603-4.

Rubin J, Murphy TC, Zhu L, Roy E, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. J Biol Chem 2003 Sep 5;278(36):34018-25.

Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, et al. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. Endocrinology 2000 Jun;141(6):2075-83.

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di CS, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell 2007 Oct 19;131(2):324-36.

Sasaki T, Hong MH. Localization of endothelin-1 in the osteoclast. J Electron Microsc (Tokyo) 1993 Jun;42(3):193-6.

Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. ScientificWorldJournal 2010;10:624-32.

Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, et al. An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. Immunity 1999 Jan;10(1):21-8.

Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. J Bone Miner Res 2009 Aug;24(8):1347-53.

Schlaeppi JM, Gutzwiller S, Finkenzeller G, Fournier B. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. Endocr Res 1997 Aug;23(3):213-29.

Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Storniolo AM, Lemler S, Nguyen AT, Hancock BA, Stout M, Skaar T, Flockhart DA. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2008 Jul;111(1)157-63.

Schriefer JL, Warden SJ, Saxon LK, Robling AG, Turner CH. Cellular accommodation and the response of bone to mechanical loading. J Biomech 2005 Sep;38(9):1838-45.

Schwarz P, Rasmussen AQ, Kvist TM, Andersen UB, Jorgensen NR. Paget's disease of the bone after treatment with Denosumab: a case report. Bone 2012 May;50(5):1023-5.

Seitz S, Priemel M, Zustin J, Beil FT, Semler J, Minne H, et al. Paget's disease of bone: histologic analysis of 754 patients. J Bone Miner Res 2009 Jan;24(1):62-9.

Selby PL, Davie MW, Ralston SH, Stone MD. Guidelines on the management of Paget's disease of bone. Bone 2002 Sep;31(3):366-73.

Semler DE, Ohlstein EH, Nambi P, Slater C, Stern PH. Endothelin-1-evoked calcium transients in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells are mediated through endothelin-A and endothelin-B receptors. J Pharmacol Exp Ther 1995 Mar;272(3):1052-8.

Seton M, Choi HK, Hansen MF, Sebaldt RJ, Cooper C. Analysis of environmental factors in familial versus sporadic Paget's disease of bone--the New England Registry for Paget's Disease of Bone. J Bone Miner Res 2003 Aug;18(8):1519-24.

Seton M. Paget disease of bone: diagnosis and drug therapy. Cleve Clin J Med 2013 Jul;80(7):452-62.

Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Semin Cell Dev Biol 2008 Oct;19(5):444-51.

Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. Bonekey Rep 2014 Jan 8;3:481.

Siris ES, Ottman R, Flaster E, Kelsey JL. Familial aggregation of Paget's disease of bone. J Bone Miner Res 1991;6:495-500.

Siris ES, Roodman GD, Langman CB, Whyte MP. Chapter 59.Paget's Disease of Bone. Primer 2006 Jan 1;6(1):320-30.

Solomon LR. Billiard-player's fingers: an unusual case of Paget's disease of bone. Br Med J 1979 Apr 7;1(6168):931.

Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, et al. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. Am J Physiol Cell Physiol 2000 Apr;278(4):C853-C860.

Street J, Bao M, Deguzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Jul 23;99(15):9656-61.

Sunyer T, Rothe L, Jiang X, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. J Cell Biochem 1996 Mar 15;60(4):469-83.

Takata S, Hashimoto J, Nakatsuka K, Yoshimura N, Yoh K, Ohno I, et al. Guidelines for diagnosis and management of Paget's disease of bone in Japan. J Bone Miner Metab 2006;24(5):359-67.

Takuwa Y, Masaki T, Yamashita K. The effects of the endothelin family peptides on cultured osteoblastic cells from rat calvariae. Biochem Biophys Res Commun 1990 Aug 16;170(3):998-1005.

Takuwa Y, Ohue Y, Takuwa N, Yamashita K. Endothelin-1 activates phospholipase C and mobilizes Ca2+ from extra- and intracellular pools in osteoblastic cells. Am J Physiol 1989 Dec;257(6 Pt 1):E797-E803.

Tan A, Ralston SH. Clinical presentation of Paget's disease: evaluation of a contemporary cohort and systematic review. Calcif Tissue Int 2014 Nov;95(5):385-92.

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. J Clin Invest 1993 Jan;91(1):257-63.

Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, et al. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. Cancer Cell 2004 Nov;6(5):485-95.

Tarquini R, Perfetto F, Tarquini B. Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? Calcif Tissue Int 1998 Aug;63(2):118-20.

Tatrai A, Foster S, Lakatos P, Shankar G, Stern PH. Endothelin-1 actions on resorption, collagen and noncollagen protein synthesis, and phosphatidylinositol turnover in bone organ cultures. Endocrinology 1992 Aug;131(2):603-7.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.

Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Chinetti G, Zawadzki C, Haulon S, Kubaszek A, et al. Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protects against atherosclerosis. J Clin Endocrinol Metab 2004 Sep;89(9):4238-42.

Teronen O, Heikkilä P, Konttinen YT. MMP inhibition and downregulation by biphosphonates. Ann NY Acad Sci 1998 Apr;878:453-65.

Thomas PB, Liu EC, Webb ML, Mukherjee R, Hebbar L, Spinale FG. Exogenous effects and endogenous production of endothelin in cardiac myocytes: potential significance in heart failure. Am J Physiol 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2629-H2637.

Tie Z, Bai R, Zhai Z, Zhang G, Zhang H, Zhao Z, Zhou D, Liu W. Single nucleotide polymorphisms in VEGF gene are associated with an increased risk of osteosarcoma. Int J Clin ExpPathol 2014 Jul;7(11)8143-9.

Tiegs RD, Lohse CM, Wollan PC, Melton LJ. Long-term trends in the incidence of Paget's disease of bone. Bone 2000 Sep;27(3):423-7.

Trebec-Reynolds DP, Voronov I, Heersche JN, Manolson MF. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. J Cell Biochem 2010 May 15;110(2):343-51.

Tsukahara H, Hori C, Hiraoka M, Yamamoto K, Ishii Y, Mayumi M. Endothelin subtype A receptor antagonist induces osteopenia in growing rats. Metabolism 1998 Nov;47(11):1403-7.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. Am J Physiol 1995;269(6 Pt 1):C1371-8.

Usategui-Marín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, González-Sarmiento R. Polymorphisms in autophagy genes are associated with Paget Disease of Bone. Plos One 2015 DOI:10.137/journal.pone.0128984.

Vallet M, Ralston SH. Biology and Treatment of Paget's Disease of Bone. J Cell Biochem 2015 Jul 24.

van Staa TP, Selby P, Leufkens HG, Lyles K, Sprafka JM, Cooper C. Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales. J Bone Miner Res 2002 Mar;17(3):465-71.

van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1- induced osteoclastic bone resorption. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Jul 5;97(14):7993-8.

van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. Endocrinology 2004 Nov;145(11):5068-74.

van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. J Bone Miner Res 1997 Nov;12(11):1797-804.

van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Immunology 2001 Jul;103(3):255-61.

Vasireddy S, Talwalkar A, Miller H, Mehan R, Swinson DR. Patterns of pain in Paget's disease of bone and their outcomes on treatment with pamidronate. Clin Rheumatol 2003 Dec;22(6):376-80.

Veillette CJ, von Schroeder HP. Endothelin-1 down-regulates the expression of vascular endothelial growth factor-A associated with osteoprogenitor proliferation and differentiation. Bone 2004 Feb;34(2):288-96.

von Schroeder HP, Veillette CJ, Payandeh J, Qureshi A, Heersche JN. Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. Bone 2003 Oct;33(4):673-84.

Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 Jan 15;105(2):686-91.

Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, Shizume K, Ohsumi K, Shibuya M, et al. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1996 Apr;11(4):472-9.

Wang FS, Kuo YR, Wang CJ, Yang KD, Chang PR, Huang YT, et al. Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1alpha activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts. Bone 2004 Jul;35(1):114-23.

Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest 2007 Jun;117(6):1616-26.

Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, Qin Q, Zhao B, Yang Y, Hui R. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. J Am Coll Cardiol 2007 Sep;50(8):760-7.

Wei X-Q, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng G-J, Huang F-P, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature 1995;375:408-11.

Wermers RA, Tiegs RD, Atkinson EJ, Achenbach SJ, Melton LJ, III. Morbidity and mortality associated with Paget's disease of bone: a population-based study. J Bone Miner Res 2008 Jun;23(6):819-25.

Witzmann F, Claeson KM, Hampe O, Wieder F, Hilger A, Manke I, et al. Paget disease of bone in a Jurassic dinosaur. Curr Biol 2011 Sep 13;21(17):R647-R648.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther 2002 Sep;302(3):1055-61.

Wu W, Shu X, Hovsepyan H, Mosteller RD, Broek D. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. Oncogene 2003 May 29;22(22):3361-70.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988 Mar 31;332(6163):411-5.

Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L, Hauschka PV. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. Matrix Biol 2008 Sep;27(7):589-99.

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. Int J Oral Sci 2012 Jun;4(2):64-8.

Yao L, Fang F, Zhong Y, Yu L. The association between two polymorphisms of eNOS and breast cancer risk: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 2010 May;124(1):223-7.

Yaroslavskiy BB, Li Y, Ferguson DJ, Kalla SE, Oakley JI, Blair HC. Autocrine and paracrine nitric oxide regulate attachment of human osteoclasts. J Cell Biochem 2004 Apr 1;91(5):962-72.

Yaroslavskiy BB, Zhang Y, Kalla SE, Garcia P, V, Sharrow AC, Li Y, et al. NO-dependent osteoclast motility: reliance on cGMP-dependent protein kinase I and VASP. J Cell Sci 2005 Dec 1;118(Pt 23):5479-87.

Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. Mol Cell Endocrinol 1999 Jul 20;153(1-2):113-24.

Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Sep 16;100(19):10954-9.

Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Mosley JR, Cheng MZ, et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. J Bone Miner Res 1999 Jul;14(7):1123-31.

Zelzer E, Olsen BR. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. Curr Top Dev Biol 2005;65:169-87.

Zhang W, Sun K, Zhen Y, Wang D, Wang Y, Chen J, Xu J, Hu FB, Hui R. VEGF receptor-2 variants are associated with susceptibility to stroke and recurrence. Stroke 2009 Feb;40(8):2720-6.