



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

## **TESIS DOCTORAL**



# **Comparación de péptidos intestinales en mujeres postmenopáusicas con y sin osteoporosis: estudio de casos y controles**

**PRESENTADA POR:  
MARÍA CRISTINA MONTES CASTILLO**

**DIRIGIDA POR:  
MARÍA JOSEFA MARTÍNEZ RAMÍREZ  
MIGUEL DELGADO RODRÍGUEZ**

**JAÉN, 2020**

**ISBN**

## **Siglas, abreviaturas y acrónimos**

**ADA** *American Diabetes Association*

**AGM** Ácidos grasos monoinsaturados

**AGP** Ácidos grasos poliinsaturados

**BMP** Proteína morfogénica del hueso

**CTX** Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I

**DE** Desviaciones estándar

**DEXA** Absorciometría dual por rayos X

**DMO** Densidad mineral ósea

**DM2** Diabetes mellitus tipo 2

**DPP4** Enzima dipeptidil peptidasa 4

**ECA** Ensayo clínico aleatorizado

**EEM** Error estándar de la media

**FRAX** *Fracture Risk Assessment Tool*

**GH** Hormona de crecimiento

**GIP** Polipéptido inhibidor gástrico

**GIP-R** Receptor del GIP

**GLP1** *Glucagon Like Peptide 1*

**GLP1-R** Receptor del GLP1

**GLP1-RA** Análogo del receptor del GLP1

**GLP1-RAs** Análogos del receptor del GLP1

**GLP2** *Glucagon Like Peptide 2*

**GLP2 RAs** Análogos del receptor del GLP2

**HbA1c** Hemoglobina glicosilada

**IDPP4** Inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa 4

**IL** Interleuquina

**IMC** Índice de masa corporal

**ISGLT2** Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2

**Kcal** Kilocaloría

**NHANES** *National Health and Nutrition Examination Survey*

**NTX** Telopéptido N-terminal de colágeno tipo I

**MDRD-4** *Modification of Diet in Renal Disease*

**M-CSF** Factor estimulante de colonias de macrófagos

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**OPG** Osteoprotegerina

**PICP** Propéptido C-terminal del colágeno tipo 1

**PINP** Propéptido N-terminal del colágeno tipo 1

**PTH** Parathormona

**Péptido YY** Péptido tirosina-tirosina

**RANK** Activador del receptor del factor nuclear kB

**RANKL** Ligando del activador del receptor del factor nuclear kB

**TECOS** *Sitagliptin Cardiovascular Outcomes Study*

**TFG** Tasa de filtrado glomerular

**TGF  $\beta$**  Factor de crecimiento tumoral  $\beta$

**TNF $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRACP5b** Fosfatasa ácida resistente a tartrato 5b

**UE** Unión Europea

**UMB** Unidad multicelular básica

**VDR** Receptor de la vitamina D

## **VIH** Virus de la inmunodeficiencia humana

# ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>10</b>
1. Osteoporosis.....	10
1.1. Concepto.....	10
1.2. Fracturas osteoporóticas .....	13
1.3. Epidemiología.....	14
1.4. Diagnóstico.....	16
1.5. Remodelado óseo.....	17
2. Relación del tejido óseo con el intestino .....	25
3. Péptidos intestinales y su relación con el tejido óseo.....	27
3.1. El péptido similar al glucagon tipo 1 y el tejido óseo.....	28
3.2. El péptido similar al glucagon tipo 2 y el tejido óseo .....	29
3.3. El polipéptido inhibidor gástrico y el tejido óseo .....	30
3.4. El péptido tirosina-tirosina y el tejido óseo.....	31
3.5. La enzima dipeptidil peptidasa 4 y el tejido óseo.....	32
4. Alimentos, nutrientes y su relación con el tejido óseo .....	33
4.1. Macronutrientes y principales grupos de alimentos... ..	33
4.2. Importancia del calcio, fósforo y vitamina D en el metabolismo óseo....	35
4.3. Otros nutrientes y su influencia sobre el metabolismo óseo.....	36
5. Indicaciones actuales de las hormonas gastrointestinales estudiadas.....	38

6. Justificación.....	40
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
1. Hipótesis.....	42
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo principal.....	42
2.2. Objetivos secundarios.....	42
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>44</b>
1. Diseño del estudio.....	44
2. Tamaño de muestra.....	44
3. Población de estudio.....	44
3.1. Grupo de casos.....	45
3.1.1. Criterios de inclusión.....	45
3.1.2. Criterios de exclusión.....	45
3.2. Grupo de controles.....	45
3.2.1. Criterios de inclusión.....	46
3.2.2. Criterios de exclusión .....	46
4. Determinación de parámetros antropométricos.....	46
5. Determinación de masa ósea.....	46
6. Determinaciones analíticas.....	46
6.1. Parámetros del metabolismo óseo y bioquímica general.....	47
6.2. Determinación de péptidos intestinales.....	47
6.3. Determinación de la actividad DPP4.....	47
7. Encuesta alimentaria.....	47

8. Resumen de variables.....	48
8.1. Descriptivas.....	48
8.2. Antecedentes personales y tratamientos farmacológicos.....	48
8.3. Determinaciones analíticas.....	48
8.3.1. Específicas.....	48
8.3.1.1. Péptidos intestinales.....	48
8.3.1.2. Parámetros del metabolismo y remodelado óseo.....	48
8.3.2. Generales.....	49
8.4. Masa ósea.....	49
8.5. Parámetros antropométricos.....	49
8.6. Ingesta alimenticia.....	49
9. Análisis de los datos.....	50
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
1. Análisis descriptivo y osteoporosis.....	54
2. Ingesta dietética y osteoporosis.....	55
3. Datos antropométricos y osteoporosis.....	56
4. Parámetros del metabolismo del remodelado óseo y osteoporosis.....	57
5. Péptidos intestinales y osteoporosis.....	58
5.1. El péptido similar al glucagón tipo 1.....	58
5.2. El péptido similar al glucagón tipo 2.....	60
5.3. El péptido YY.....	61
5.4. La enzima DPP4.....	61

<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>IX. TABLAS.....</b>	<b>81</b>
<b>X. ANEXO 1. Publicación asociada a esta tesis.....</b>	<b>100</b>
<b>XI. ANEXO 2. Composición del preparado nutricional.....</b>	<b>109</b>



## I. RESUMEN

**Introducción:** La osteoporosis es la consecuencia de un desequilibrio en el remodelado óseo, y se sabe que la remodelación ósea sigue un ritmo circadiano, determinado por una relación funcional intestino-tejido óseo. Estudios previos han mostrado que los mediadores serían determinados péptidos intestinales. Tanto el *Glucagon Like Peptide 1* (GLP1), el *Glucagon Like Peptide 2* (GLP2) y el péptido tirosina-tirosina (péptido YY) se han asociado con la salud ósea. Nuestro objetivo principal fue determinar si el GLP1, el GLP2, y la enzima encargada de su metabolización, la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), además del péptido YY se asocian con la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas no diabéticas.

**Métodos:** Estudio de casos (n = 43) y controles (n = 43) emparejados por edad (+/- 1 año) realizado en mujeres postmenopáusicas. Los casos fueron mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de osteoporosis mediante absorciometría dual por rayos X (DEXA). Los controles fueron mujeres sanas de similar edad sin osteoporosis ni antecedentes de fractura osteoporótica. Para ambos grupos se establecieron criterios de inclusión y exclusión. Se determinaron niveles plasmáticos postprandiales del GLP1, GLP2, péptido YY, y la actividad de la enzima DPP4, junto con la densidad mineral ósea (DMO), marcadores de remodelado óseo (en ayunas), y la ingesta alimentaria mediante un cuestionario de consumo alimentario.

**Resultados:** Los valores postprandiales del GLP1 fueron más bajos ( $p < 0.001$ ) en el grupo de los casos [media (error estándar de la media, EEM) = 116.25 (2.68)], que en los controles, [media (EEM) = 126.79 (2.68)]. Además el GLP1 se asocia con una disminución del riesgo de osteoporosis en el análisis crudo de regresión logística [*Odds ratio*, OR (95 % CI) = 0.724 (0.53-0.97),  $p = 0.031$ ] y en el análisis ajustado [OR (95 % CI) = 0.603 (0.38-0.94),  $p = 0.027$ ]. No se encontró asociación entre el GLP2, el péptido YY o la actividad DPP4 con la osteoporosis.

**Conclusiones:** Los niveles postprandiales del GLP1 están relacionados con la osteoporosis y con el riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas no diabéticas. Son necesarios más estudios que avalen estos resultados.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Osteoporosis

#### 1.1. Concepto

La osteoporosis es una enfermedad esquelética progresiva y sistémica, caracterizada por una disminución de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea que predispone al riesgo de fracturas (1)(2), como resultado de un desequilibrio en el remodelado óseo, entre los fenómenos de formación y resorción ósea. En circunstancias normales estos procesos de resorción y de formación están estrechamente acoplados para que no exista cambio neto en la masa ósea (3).

La osteoporosis primaria es la forma más común de osteoporosis e incluye tanto la osteoporosis posmenopáusica como la relacionada con la edad. Por el contrario, la osteoporosis secundaria es consecuencia de una enfermedad sistémica o intervención farmacológica y su etiología incluye (4):

a) Causas endocrinas o metabólicas: acromegalia, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (DM2), deficiencia de la hormona de crecimiento, hipercortisolismo, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, hipofosfatasa, porfiria y embarazo.

b) Alteraciones gastrointestinales y nutricionales: alcoholismo, anorexia nerviosa, deficiencia de calcio, enfermedad hepática crónica, síndromes de malabsorción/ malnutrición (incluyendo la enfermedad celiaca, fibrosis quística, enfermedad de Crohn, y resección gástrica o bypass), nutrición parenteral total y deficiencia de vitamina D.

c) Fármacos: antiepilépticos, inhibidores de la aromatasa, quimioterapia/inmunosupresores, acetato de medroxiprogesterona, glucocorticoides, agonistas/antagonistas de hormonas liberadoras de gonadotropinas, heparina, litio, inhibidores de la bomba de protones, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (ISGLT2), tiazolidinediona, hormona tiroidea (en dosis suprafisiológica).

d) Trastornos del metabolismo del colágeno: síndrome de Ehlers-Danlos, homocistinuria debida a deficiencia de cistationina, síndrome de Marfan y osteogénesis imperfecta.

e) Otros: sida/virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Gaucher, hemofilia, hipercalciuria, inmovilización, depresión mayor, mieloma múltiple y otros tumores, trasplante de órganos, fallo/insuficiencia renal, acidosis tubular renal, artritis reumatoide, mastocitosis sistémica y talasemia.

Las causas más comunes de osteoporosis secundaria son el tratamiento con glucocorticoides y la inmovilización (5).

El esqueleto es un órgano muy dinámico que sufre constantemente cambios y regeneración. Está formado por células óseas especializadas, matriz de tejido conjuntivo mineralizado y no mineralizado y espacios que incluyen la cavidad de la médula ósea, canales vasculares, canalículos y lagunas donde se encuentran los osteocitos. El tejido óseo también contiene agua, que representa al menos el 25 % de su peso húmedo y proporciona gran parte de su fuerza y resistencia (6). Tiene funciones estructurales y metabólicas. Su función estructural es fundamental para la locomoción, la respiración y la protección de los órganos internos, y su función metabólica consiste en que actúa como almacén del calcio, fósforo y carbonato, y puede contribuir a amortiguar los cambios en la concentración de iones de hidrógeno (6).

El esqueleto humano adulto está compuesto de hueso cortical y esponjoso o trabecular. El hueso cortical es el encargado de proveer la estabilidad al sistema esquelético y el hueso trabecular se encarga de amortiguar y soportar la mayor parte del peso corporal, además de albergar la médula ósea (6).

Además el tejido óseo está formado por células especializadas que se encargan de su correcta homeostasis y son las siguientes:

a) Osteoblastos: se diferencian de las células madre mesenquimales, pero también pueden derivar de las células del revestimiento óseo y potencialmente de los condrocitos (7). Los osteoblastos tienen tres destinos posibles: pueden convertirse

para formar parte del revestimiento óseo celular, en un osteocito o sufrir apoptosis (8). Secretan el colágeno tipo 1, lo que le confiere la propiedad de sintetizar la matriz ósea (9). La osteoblastogénesis es controlada por la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (10).

b) Osteoclastos: son células altamente especializadas derivadas de los preosteoclastos y miembros del sistema mononuclear fagocítico. Se encargan de la resorción, es decir, de la destrucción de tejido dañado para su posterior reemplazo por la matriz ósea nueva que posteriormente será mineralizada. Dicha función la realizan a través de la acidificación y proteólisis de los componentes de la matriz. Los podosomas facilitan la adhesión a la superficie ósea y la formación de una zona de sellado proporciona un microambiente ácido aislado dentro del cual el osteoclasto puede disolver el mineral y digerir la matriz ósea (11). La diferenciación es iniciada por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y promovida por el ligando del activador del receptor de factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) que actúa sobre el activador del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) en las células precursoras (12).

c) Osteocitos: son las células estructurales del tejido óseo, derivan de la diferenciación y mineralización de los osteoblastos; a pesar de ello, no poseen la capacidad de secretar matriz ósea, pero sí presentan propiedades mecanosensoras que transducen señales para dirigir el remodelado óseo y regulan la acción de los osteoclastos y osteoblastos (13).

Como se ha mencionado anteriormente, la osteoporosis tiene muchas y diversas causas, pero el desacoplamiento del ciclo de remodelado óseo y el aumento de la resorción ósea es un mecanismo fisiopatológico subyacente común (4)(14).

La fisiopatología de las causas primarias de osteoporosis se detallan a continuación:

- Osteoporosis posmenopáusica: la menopausia provoca una disminución de las concentraciones de estrógenos, y en consecuencia acontece un aumento de la formación y la resorción ósea, pero la actividad resorptiva excede a la formación. El mecanismo molecular y celular de esta entidad radica en que la deficiencia de estrógenos da lugar a un incremento de las citoquinas, incluidas la interleuquina-1

(IL-1), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), que incrementan el RANKL y disminuyen la osteoprotegerina (OPG), lo que produce a la osteoclastogénesis y resorción ósea (5)(15).

- Osteoporosis relacionada con la edad: se debe a la combinación de la edad y factores posmenopáusicos en las mujeres y a factores relacionados con la edad en los hombres. Tiene una etiología multifactorial, con influencia de factores genéticos y del estilo de vida. En esta entidad la osteoblastogénesis y la formación ósea están reducidas por una disminución de la actividad de la hormona de crecimiento y un aumento de la parathormona. La deficiencia de hormonas sexuales en hombres conduce a una disminución de las concentraciones de estrógenos en el hueso (se convierten por la aromatasa) lo que ocasiona un incremento de la osteoclastogénesis y resorción ósea (5).

## 1.2. Fracturas osteoporóticas

La importancia de la osteoporosis radica en la posibilidad de desarrollar fracturas por fragilidad, que se definen como aquellas que ocurren espontáneamente o por un trauma menor, como una caída desde una altura de pie o menos (16). Las fracturas por fragilidad suelen ocurrir en columna vertebral, en los extremos proximales del fémur y el húmero, y en el extremo distal del radio (fractura de Colles) (17)(18). El trauma tras una caída es la causa más frecuente de fractura de huesos largos (fémur, húmero y radio), mientras que es más difícil determinar la causa y el momento en el que ocurren las fracturas vertebrales, que a menudo permanecen sin diagnosticar (18). Se trata de una complicación muy prevalente ya que representan el 80% de las fracturas en mujeres menopáusicas de más de 50 años, y además la presencia de fractura de cadera, vertebral y no vertebral incrementa el riesgo de otras fracturas y la mortalidad posterior (19).

Las fracturas por fragilidad son una causa importante de morbilidad en la población. Las fracturas de cadera causan dolor agudo y pérdida de la función, y la mayoría precisan hospitalización. La recuperación es lenta y la rehabilitación a menudo es incompleta, con muchos pacientes que deben permanecer institucionalizados en residencias de ancianos. Las fracturas vertebrales pueden causar dolor agudo y pérdida de la función, pero también pueden cursar de manera

asintomática. Sin embargo, las fracturas vertebrales ocurren con mucha frecuencia, y la discapacidad aumenta con el número de fracturas. Las fracturas distales radiales también provocan dolor agudo y pérdida de la función, pero la recuperación funcional suele ser muy buena (20).

Otros factores que pueden afectar al aumento del riesgo de fracturas por fragilidad incluyen el uso de glucocorticoides, edad, sexo, fracturas previas y antecedentes familiares de osteoporosis (19).

El esqueleto humano adulto está compuesto de hueso cortical y esponjoso o trabecular, cuyas proporciones varían según el lugar. En las vértebras, predomina el hueso trabecular, mientras que los huesos largos contienen principalmente hueso cortical (21). La osteoporosis posmenopáusica se caracteriza por una rápida pérdida de masa ósea trabecular con perforación del hueso, mientras que el hueso cortical se afecta menos. Esta pérdida es la responsable de las fracturas por fragilidad debido a la carga, especialmente vertebrales y en el radio distal (20).

### 1.3 Epidemiología

La prevalencia de osteoporosis aumenta considerablemente con la edad, del 2% a los 50 años a más del 25% a los 80 años en las mujeres, como consecuencia de la pérdida de masa ósea en mujeres después de la menopausia y a la pérdida ósea relacionada con la edad tanto en hombres como en mujeres. A medida que aumenta la longevidad de la población aumenta la incidencia de osteoporosis y su consecuencia principal, la fractura por fragilidad (19).

En el año 2010 en la Unión Europea (UE), se estimó que 22 millones de mujeres y 5.5 millones de hombres tenían osteoporosis utilizando el criterio de diagnóstico de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1)(22). El número de nuevas fracturas en 2010 en la UE se estimó en 3.5 millones, que se corresponde aproximadamente en 610 000 fracturas de cadera, 520 000 fracturas vertebrales, 560 000 fracturas de antebrazo y 1 800 000 otras fracturas (pelvis, costillas, húmero, tibia, peroné, clavícula, escápula, esternón y otras fracturas femorales). Dos tercios de todas las fracturas ocurrieron en mujeres. Debido al aumento en la esperanza de

vida, el número anual de fracturas por fragilidad aumentará de 3.5 millones en 2010 a 4.5 millones en 2025, lo que corresponde a un aumento del 28% (20).

Según el *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) que se realizó en el 2010 en Estados Unidos, aproximadamente 10.2 millones de estadounidenses padecían osteoporosis y 43 millones presentaban baja masa ósea (23)(24).

En el año 2000 se ha estimado en todo el mundo un total de nueve millones de fracturas osteoporóticas (25). En una revisión sistemática del año 2012 (26)(24), la tasa de fractura de cadera anual mundial en mujeres varió de menos de 100 a casi 600 por 100 000 hab. y la tasa de fractura vertebral de menos de 100 a casi 1 400 por 100 000 hab., dependiendo de la región. Las tasas más altas de fractura de cadera se produjeron en los países escandinavos, mientras que las tasas más altas de fractura vertebral se produjeron en Corea del Sur y en Estados Unidos (27).

Es ampliamente reconocido que la osteoporosis y en consecuencia las fracturas osteoporóticas se asocian a una mayor mortalidad, con la excepción de las fracturas de antebrazo (28).

La fractura de cadera merece una mención especial, ya que la mayoría precisa tratamiento quirúrgico y rehabilitación posterior. Más del 50% de los pacientes ingresados en el hospital con fractura de cadera son mayores de 80 años. Alrededor del 2% de las caídas en los ancianos provocan fracturas (29). Hasta el 40% de las fracturas de cadera ocurren en pacientes que viven en residencias de ancianos, que muy probablemente esté relacionado con la edad avanzada, con una alta prevalencia de comorbilidades que requieren atención a largo plazo y un alto riesgo de caídas recurrentes en esta población (22).

El coste de la osteoporosis en la UE en 2010, incluyendo los tratamientos farmacológicos, se estimó en 37 000 millones de euros (20). Cabe destacar la fractura de cadera, ya que los costos directos derivados de esta afección son enormes por requerir un largo periodo de hospitalización y rehabilitación posterior. Además se asocia con otras consecuencias negativas, como la discapacidad, depresión y enfermedad cardiovascular, con costos adicionales para la sociedad (29).

#### 1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de osteoporosis se establece por mediciones de la densidad mineral ósea (DMO), siendo la prueba de referencia la absorciometría dual por rayos X (DEXA) y/o por la presencia de fracturas por fragilidad. La medición se realiza en regiones corporales estratégicas como columna, cadera y antebrazo. Los resultados de las mediciones de DMO se expresan en términos del índice T (*T-score*) que es el número de desviaciones estándar (DE) que la medición de DMO difiere de la densidad ósea medida en la población joven (“pico” de la DMO). También se expresan los resultados con el índice Z (*Z-score*), que se obtiene al comparar la medición de la DMO con valores de referencia de sujetos de igual sexo y edad (20).

Se define la osteoporosis cuando existe un valor igual o menor que  $-2.5$  DE de *T-score* y baja masa ósea (osteopenia) entre  $-1$  y  $-2.5$  DE de *T-score* medidos en DEXA (30).

La masa ósea máxima se alcanza a los 30 años. La pérdida ósea se produce de manera constante a partir de los 40 años (0.3-0.5% por año), con pérdida acelerada en el periodo perimenopáusico (4-6% por año), previo a disminuir nuevamente después de los 70 años (1-2% por año). Por lo tanto, la edad es el predictor más fuerte del riesgo de fractura (31).

La DMO es un factor de riesgo importante para la fractura por fragilidad: por cada disminución de una DE en la DMO, el riesgo de fractura aumenta de 2 a 3 veces (32). Además de la baja DMO se han identificado una serie de factores de riesgo clínico para las fracturas y deben utilizarse junto con la DMO para calcular el riesgo de fractura de un individuo. Dentro de los factores de alto riesgo de fractura se encuentran: 1) edad  $>70$  años; 2) bajo peso corporal o pérdida ponderal significativa; 3) inactividad física; 4) fármacos: corticosteroides ( $\geq 5$  mg de prednisolona al día o equivalente durante  $> 3$  meses), anticonvulsivos, tiazolidinedionas, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, tiroxina, inhibidores de la aromatasas y quimioterapia; 5) tabaquismo; 6) alcohol ( $\geq 2$  bebidas estándar/día); 7) antecedentes de fractura por fragilidad; 8) antecedentes familiares de fractura de cadera; 9) baja exposición a la luz solar (31).



La densidad mineral ósea proporciona una estimación de la osteoporosis, aunque es insuficiente para predecir el riesgo de fractura de un individuo (31).

Por ello se han desarrollado modelos matemáticos para la predicción del riesgo de fractura. La herramienta FRAX es la más utilizada en todo el mundo y calcula el riesgo a 10 años de una fractura osteoporótica de cadera o mayor (cadera, columna vertebral clínica, húmero o muñeca). Al combinar factores de riesgo clínico con la densidad mineral ósea y la edad, la sensibilidad de la predicción de fracturas mejora sin reducir la especificidad. Una probabilidad de 10 años de una fractura de cadera superior al 5%, o de una fractura osteoporótica mayor de más del 20%, es significativa y se debe considerar el tratamiento antirresortivo (33)(31).

### 1.5. Remodelado óseo

A lo largo de la vida el esqueleto, como órgano dinámico, es contruido y reconstruido por dos procesos: el modelado y la remodelación ósea (34). Ambos procesos implican la resorción ósea osteoclástica y la formación ósea osteoblástica. En el modelado la resorción y la formación se producen independientemente en sitios esqueléticos distintos para dar lugar a cambios importantes en la arquitectura ósea. Por el contrario, en el remodelado óseo la resorción osteoclástica y la formación ósea osteoblástica están estrechamente acopladas, tanto espacial como temporalmente, para que el volumen y la estructura ósea en general permanezcan sin cambios (35)(36).

El remodelado óseo es un complejo sistema de homeostasis de la masa ósea, con un eficiente sistema de autocontrol, regulado por numerosos factores entre los que se incluyen factores genéticos, mecánicos, hormonales, nutricionales y factores de crecimiento. En circunstancias normales el ciclo de remodelado óseo reemplaza el hueso dañado y es un proceso altamente regulado y de por vida para preservar la integridad ósea y mantener la homeostasis mineral (36). Definido por primera vez por Frost, el ciclo de remodelado óseo es un proceso estrictamente regulado que reemplaza el hueso viejo y dañado por uno nuevo (37).

Anatómicamente, el remodelado óseo tiene lugar dentro de la unidad multicelular básica (UMB), que se compone de osteoclastos, osteoblastos y

suministro de sangre capilar (5)(38)(39). La UMB dura más que la vida útil de los osteoblastos y osteoclastos dentro de ella y por tanto requiere la reposición constante de estas células, que está estrictamente controlada por los osteocitos (13).

Los osteocitos dirigen la remodelación ósea mediante la regulación de la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos y, por tanto, la resorción y formación ósea (5)(13). Como se ha mencionado, la señal de inicio se origina en los osteocitos que utilizan su extensa red de procesos dendríticos para enviar señales a otras células (40). Los osteocitos son el tipo de célula más abundante en el hueso y se distribuyen por toda la matriz ósea mineralizada, formando una red interconectada que los posiciona idealmente para detectar y responder a estímulos locales y sistémicos para regular la remodelación y adaptación ósea (41).

El hueso es un tejido activo que se remodela constantemente en respuesta al estrés mecánico y cambios hormonales. El proceso de remodelación ósea comienza con la resorción ósea, durante la cual los osteoclastos digieren el hueso viejo. La siguiente fase es la inversión, donde aparecen células mononucleares en la superficie del hueso. La fase final es la de formación, cuando los osteoblastos depositan hueso nuevo hasta que el hueso reabsorbido se reemplaza por completo (42).

Las vías de señalización clave que controlan la resorción ósea osteoclástica y la formación ósea osteoblástica son el RANK/RANKL/OPG y la vía de señalización Wnt canónica. Como reguladores endocrinos se incluyen la hormona paratiroidea, la vitamina D, la calcitonina, la hormona de crecimiento, los glucocorticoides, las hormonas sexuales y la hormona tiroidea, y como reguladores paracrinos del ciclo se encuentran las citocinas, los factores de crecimiento y las prostaglandinas (5)(43).

La identificación de la vía de señalización RANK/RANKL/OPG fue un gran avance en la comprensión de la regulación de la osteoclastogénesis en el ciclo de remodelado y proporcionó la diana terapéutica para el novedoso fármaco antirresortivo denosumab (44)(45).

El RANK es una proteína transmembrana que se expresa en la membrana de los osteoclastos (12). El RANKL es también una proteína transmembrana producida por los osteoblastos, osteocitos y los condrocitos, (46)(47) si bien se cree que son los

osteocitos los que perciben los cambios y el microdaño y estimulan la osteoclastogénesis a través de la producción de RANKL al inicio del ciclo de remodelado óseo (47).

La unión del RANKL a su receptor, el RANK, promueve la activación de la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B y como resultado genera la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, facilitando la resorción de hueso (12)(48).

La OPG es una proteína secretada por los osteoblastos y osteocitos; presenta una alta actividad protectora de tejido óseo debido a su función de “receptor señuelo” de RANKL y es capaz de inhibir la resorción ósea osteoclástica al unirse al RANKL y evitar su unión al RANK (46)(49).

Por lo tanto, la relación RANKL- OPG es clave en la regulación de la resorción ósea, la masa ósea y la integridad esquelética (46)(50).

Se ha establecido en los últimos años que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es un regulador principal de la formación ósea y el mantenimiento de la homeostasis esquelética (51) (52). La activación de esta vía se inicia en la membrana celular con la unión del ligando Wnt a los receptores transmembrana de la familia Frizzled. Esta unión recluta un correceptor que se trata de una proteína relacionada con lipoproteínas para formar un complejo ternario que desestabiliza un conglomerado citoplasmático de proteínas que, de lo contrario, fosforilarían a la  $\beta$ -catenina del citoplasma para su destrucción en el proteosoma. Por lo tanto, tras la unión del ligando al receptor se bloquea la acción del complejo de destrucción que conduce a la acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, desde donde se trasladará al núcleo para activar la transcripción del gen diana, que origina la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (52)(53).

## **Regulación endocrina del ciclo de remodelado óseo**

### **a) Parathormona (PTH)**

La hormona paratiroidea tiene efectos opuestos en la remodelación ósea en función de la duración de la exposición. La PTH en infusión continua estimula la resorción ósea y es un mecanismo clave en la homeostasis del calcio. Esta hormona

ejerce sus efectos catabólicos a través del sistema de señalización RANK/RANKL/OPG: aumenta el RANKL e inhibe la OPG para estimular la osteoclastogénesis (5).

Por el contrario, la PTH administrada de manera intermitente se utiliza como fármaco anabólico en el tratamiento de la osteoporosis. La estimulación intermitente del receptor de PTH aumenta la señalización canónica de Wnt lo que produce un aumento de la osteoblastogénesis, y como consecuencia un aumento de la formación ósea (45).

### **b) Vitamina D**

La 1,25-dihidroxitiamina D aumenta la absorción intestinal de calcio y fosfato lo que proporciona los sustratos para la mineralización ósea. Sin embargo, las acciones de esta vitamina en el remodelado óseo siguen siendo inciertas, aunque varios estudios han informado de la expresión del receptor de la vitamina D (VDR) en los precursores de los osteoclastos, osteoblastos y en los osteocitos, lo que sugiere que también puede ejercer efectos directos sobre el hueso (54)(55).

### **c) Calcitonina**

La calcitonina se sintetiza en las células C parafoliculares de la glándula tiroidea, pero su papel sobre el hueso sigue siendo incierto. Se sabe que en concentraciones farmacológicas esta hormona inhibe la resorción ósea (5).

### **d) Hormona tiroidea**

La hormona tiroidea estimula directamente la diferenciación y mineralización de los osteoblastos. En el hipotiroidismo existe un alargamiento del ciclo de remodelado óseo con bajo recambio óseo y aumento de la masa ósea; por el contrario, en el hipertiroidismo existe una disminución de la duración del remodelado óseo con aumento en el recambio óseo, predomina la resorción ósea y en consecuencia se produce pérdida ósea (14)(56).

### **e) Hormona de crecimiento y factor de crecimiento similar a la insulina 1**

La hormona de crecimiento (GH) induce la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina 1, y aumenta el recambio óseo al estimular tanto la formación como la resorción ósea. Sin embargo, predomina la formación ósea osteoblástica y ocurre un pequeño aumento neto de la masa ósea (57). Por el contrario, en la deficiencia de GH la resorción ósea supera a la formación, lo que finalmente conduce a la osteoporosis (14).

### **f) Glucocorticoides**

Los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas causan osteoporosis (58). Los glucocorticoides inhiben la diferenciación y la función de los osteoblastos y aumentan la apoptosis de los osteoblastos. Por el contrario, los glucocorticoides aumentan la resorción ósea osteoclástica al reducir la OPG, aumentar la expresión de RANKL por los osteoblastos y aumentar la expresión de RANK en los osteoclastos (59)(60). También se sabe que los glucocorticoides en concentraciones fisiológicas tienen un efecto anabólico sobre el recambio óseo.

### **g) Hormonas sexuales**

La osteoporosis posmenopáusica se caracteriza por el desacoplamiento del ciclo de remodelado óseo con un aumento de la resorción ósea osteoclástica en relación con la formación ósea osteoclástica, lo que produce una pérdida de la masa ósea.

Con la aparición de la menopausia las concentraciones de estrógenos disminuyen rápidamente y esta disminución va en paralelo con una pérdida ósea acelerada y progresiva (61), lo que provoca un aumento de la actividad resorptiva ósea que supera la formación del hueso. En consecuencia se produce un aumento en la tasa de activación de las UMB compuestas por osteoclastos y osteoblastos que reabsorben secuencialmente hueso viejo y forman hueso nuevo. Por lo tanto, en más lugares de la superficie ósea se experimenta una resorción activa, con una prolongación del tiempo de resorción osteoclástica y un acortamiento relativo del tiempo para la formación de hueso osteoblástico (8). Con los cambios que acontecen en la menopausia, los marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea,

medidos en sangre u orina, aumentan considerablemente. La resorción ósea aumenta aproximadamente en un 90% en comparación con la etapa premenopáusica, mientras que la formación ósea aumenta solo en un 45%, lo que origina una pérdida de masa ósea (62).

El estrógeno actúa a través del receptor estrogénico  $\alpha$ , inhibe la resorción ósea al reducir el número y la actividad de los osteoclastos y aumentar la apoptosis de los osteoclastos. El estrógeno también inhibe la apoptosis de los osteoblastos y los osteocitos para mantener la formación ósea y limitar la remodelación ósea (5).

La aromatasa convierte a los andrógenos en estrógenos, y en las mujeres posmenopáusicas los esteroides suprarrenales son la única fuente de estrógenos. La aromatasa juega un papel importante en la masa ósea en los hombres, ya que se ha demostrado que el estrógeno, en lugar de las concentraciones de andrógenos, determina la masa ósea en el envejecimiento de los hombres (5).

La deficiencia de estrógenos o andrógenos induce un aumento en la remodelación ósea: aumenta tanto la formación como la resorción ósea, pero el desacoplamiento produce que la resorción supere a la formación.

## **Regulación paracrina del ciclo de remodelado óseo**

### **a) Factores de crecimiento**

El factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) y la proteína morfogénica del hueso (BMP) son miembros de la superfamilia TGF  $\beta$  y están presentes en la matriz ósea. Inducen la expresión del factor de transcripción de osteoblastos, el Runx 2, que se requiere para iniciar la diferenciación de los osteoblastos (63).

### **b) Prostaglandinas**

Las prostaglandinas actúan localmente a través de receptores acoplados a la proteína G para regular la resorción y la formación ósea. La prostaglandina E<sub>2</sub> es un potente estimulador de la resorción ósea y se cree que actúa aumentando la relación RANKL/OPG para mejorar la osteoclastogénesis, aunque también estimula la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos para aumentar la formación ósea.

Parece ser que estas acciones divergentes resultan de la unión de la prostaglandina  $E_2$  a diferentes receptores de proteína G (64).

### **c) Citocinas**

Las citocinas, como IL-1 e IL-6, y  $TNF\alpha$  pueden estimular la osteoclastogénesis, mientras que otras, como la IL-4 y el interferón gamma, inhiben la formación de los osteoclastos (65).

En las mujeres posmenopáusicas estas citocinas juegan un papel importante en la fisiopatología de la osteoporosis. La deficiencia de estrógenos produce un aumento de IL-1, IL-6 y  $TNF\alpha$ , lo que aumenta la expresión de RANKL y aumenta la osteoclastogénesis y la resorción ósea (66).

### **Marcadores de remodelado óseo**

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son sustancias liberadas a la circulación durante el proceso de formación y/o resorción que reflejan la actividad metabólica del tejido en un momento puntual y por tanto pueden ser útiles en la evaluación de los trastornos metabólico óseos. Las características comunes de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son que permiten un análisis dinámico y global del esqueleto, que no son pruebas invasoras y que permiten identificar cambios del remodelado a corto plazo. Su principal limitación es la alta variabilidad de estas determinaciones (67).

Los marcadores bioquímicos de remodelado son enzimas, u otras proteínas, secretadas por los osteoblastos o los osteoclastos, o bien productos que se originan durante la formación o degradación del colágeno tipo 1, la principal proteína que forma la matriz orgánica del hueso.

Dentro de los marcadores de formación ósea se incluyen: propéptidos N-terminales y C-terminales de colágeno tipo 1 (PINP y PICP, respectivamente), osteocalcina y fosfatasa alcalina ósea, y dentro de los marcadores de resorción ósea se encuentran: el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (CTX), el telopéptido N-terminal de colágeno tipo I (NTX), las piridinolinas y la fosfatasa ácida resistente a tartrato 5b (TRACP5b)(68).

## **Marcadores de formación ósea**

### **a) Fosfatasa alcalina ósea específica**

Se trata de una enzima que se produce durante la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos. La fosfatasa alcalina total se confunde con otras fuentes, incluidas las fuentes hepáticas, intestinales y placentarias. La fosfatasa alcalina específica del hueso intenta medir solo la fracción ósea y se correlaciona con la actividad anabólica ósea. No muestra cambios significativos con el ritmo circadiano, la alimentación ni con la función renal (67).

### **b) PINP y PICP**

El PINP y el PICP son propéptidos de los extremos opuestos del principal producto de la proteína secretora de los osteoblastos, el colágeno tipo 1. Se escinden del colágeno tipo 1, por lo que se corresponden con la producción de colágeno tipo 1 por parte de los osteoblastos (67).

El PINP se ha estudiado más extensamente que el PICP y es el biomarcador estándar para la formación ósea. El PINP es un parámetro estable con buena precisión y una variabilidad intraindividual relativamente baja (69). Su estabilidad permite un transporte y almacenamiento prolongados (70).

### **c) Osteocalcina**

La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante que se encuentra dentro de la matriz ósea, la cual es secretada por osteoblastos. Existe en la circulación en dos formas principales: la  $\gamma$ - carboxilada y la subcarboxilada (que carece de  $\gamma$ - carboxilación en uno o más sitios) (71), y es la forma carboxilada la que presenta alta afinidad por el ión calcio y como consecuencia la que se encuentra implicada en la mineralización ósea (72).

La osteocalcina también puede liberarse durante la resorción ósea, aunque lo que se ha demostrado es que se correlaciona bien con la formación ósea medida por estudios de histomorfometría ósea (73). Se sabe que es menos estable que otros marcadores del recambio óseo y debe procesarse a las pocas horas de la recogida de



muestras. La osteocalcina se ve afectada por la función renal y varía con el ritmo circadiano (69).

### **Marcadores de resorción ósea**

Los marcadores de resorción ósea incluyen el CTX, el NTX, las piridinolinas y la TRACP5b. La mayoría de los biomarcadores de resorción ósea son productos de degradación del colágeno tipo 1, a excepción del TRACP5b, que es una enzima que refleja la actividad metabólica de los osteoclastos (68).

#### **a) CTX**

El CTX es el biomarcador estándar para la resorción ósea. Las regiones telopépticas del colágeno se cortan durante la resorción ósea, de modo que sus niveles se correlacionan con la actividad de la resorción ósea. Es un biomarcador estable que disminuye rápidamente con la terapia antirresortiva. Los niveles varían significativamente con el ritmo circadiano y la alimentación (74). Los niveles son más altos en la segunda mitad de la noche entre 1:30 a.m. y 4:30 a.m. y el punto más bajo en la tarde de 11 a.m. a 3 p.m. (75).

La medición óptima del suero se realiza después de un ayuno nocturno durante la mañana para mitigar los efectos de la variación diurna y la alimentación. Los niveles no son precisos en caso de insuficiencia renal y puede aumentar hasta 5 veces en pacientes en hemodiálisis (76).

La fundación internacional de osteoporosis y la federación internacional de química clínica y medicina de laboratorio propusieron al PINP como biomarcador estándar para la formación ósea y el CTX como un biomarcador estándar para la resorción ósea (77).

## **2. Relación del tejido óseo con el intestino**

El remodelado óseo se produce con un ritmo circadiano, que se refleja en las concentraciones plasmáticas de los marcadores de remodelado óseo. Se ha propuesto que este ritmo está parcialmente regulado por la PTH y puede estar modulada por factores externos, como el patrón de alimentación (78).

Se ha demostrado una elevación de los marcadores de remodelado óseo durante la noche y su disminución durante el día (79), y es la principal causa del ritmo circadiano del remodelado óseo la variación en la ingesta de alimentos. Así, el ritmo de remodelado se ve afectado por la ingesta de alimentos, el cual aumenta por la noche con el ayuno nocturno, siendo la resorción ósea el proceso más afectado (80)(81), mientras que los parámetros de formación ósea no se ven alterados (82), es decir, se sabe que la resorción ósea se reduce con la ingesta de alimentos durante el día y aumenta con el ayuno nocturno independientemente de la edad, el sexo o el estado menopáusico (83). No se ha encontrado relación entre esta variación circadiana en el remodelado óseo y la secreción de cortisol (84) o melatonina (85).

Los marcadores de resorción ósea (incluido el CTX) siguen un ritmo circadiano, con un pico a las 5:00 h a.m. y un nadir a 14:00 h (78). Los marcadores de formación ósea muestran un ritmo menos acusado lo que probablemente se deba a un ritmo endógeno, pero también en parte a la alimentación. En el ayuno este ritmo circadiano se atenúa, mientras que la ingesta de un desayuno reduce el CTX sérico en un 40% (86)(74).

La ingesta de alimentos es la principal causa de reducción de la resorción ósea durante el día, que va seguida por un aumento nocturno de la misma con el ayuno (87). Estos hechos, junto con otros como la mayor respuesta del remodelado óseo a la administración oral de glucosa que con una administración intravenosa (88), reafirman la idea de una relación funcional entre intestino y metabolismo óseo, que posiblemente estaría mediado por hormonas, que responderían ante la absorción de nutrientes (89)(90).

Hay evidencia que los efectores más importantes de la respuesta aguda que se produce en el metabolismo óseo en relación con la ingesta de alimentos son los péptidos intestinales (81). Así se ha mostrado la existencia de una relación de estas hormonas con el remodelado óseo, con datos preliminares sugestivos de efectos positivos de varios de estos péptidos intestinales sobre la regulación de la resorción ósea que se produce como respuesta a la alimentación (91).

### 3. Péptidos intestinales y su relación con el tejido óseo

Los péptidos intestinales son un conjunto de sustancias (algunos con carácter hormonal) que se producen en el aparato digestivo e intervienen en la regulación de las diferentes etapas de la digestión. La investigación de estos péptidos ha sido de interés fundamental en los últimos años sobre todo en relación con el metabolismo de la glucosa y la DM2 (92)(93), pero también ha puesto de manifiesto su implicación en otras áreas del metabolismo intermediario y destacan sus efectos a nivel del tejido óseo y su posible relación con la osteoporosis (94)(95).

Del conjunto de hormonas gastrointestinales que se han relacionado con la salud ósea destacan el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1), el péptido inhibidor gástrico (GIP), el péptido similar al glucagón tipo 2 (GLP2) y en menor medida el péptido tirosina-tirosina (péptido YY) (96), que especialmente se ha relacionado con la masa ósea en individuos en situación de déficit energético (97)(98). También se ha relacionado con el tejido óseo la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) que se encarga de la degradación del GLP1, GIP y GLP2.

El GLP1 y el GIP son las hormonas incretínicas más relevantes. Se conoce como efecto incretina el efecto estimulador de la secreción de insulina mediado por hormonas gastrointestinales y es el responsable de la mayor secreción de insulina conseguida cuando se administra glucosa por vía oral en lugar de por vía endovenosa. El GLP1 es secretado por las células L intestinales del íleon y el colon, y el GIP es secretado por las células K del duodeno y del yeyuno proximal (99). Una vez secretadas ambas incretinas, los niveles circulantes disminuyen rápidamente como consecuencia de la inactivación de estos péptidos por parte de la DPP4 (100).

El efecto incretina produce un incremento de la secreción de insulina dependiente de glucosa, es decir en respuesta a la ingesta, que representa el 20-60% de la insulina postprandial. Además las incretinas enlentecen el vaciado gástrico, inhiben el inapropiado aumento postprandial de glucagón y estimulan la captación hepática de glucosa, a la vez que inhiben su formación. Asimismo, el GLP1 reduce el apetito por sus efectos a nivel central y como consecuencia de la sensación de plenitud postprandial secundaria al enlentecimiento del vaciado gástrico (99)(101).

Se ha demostrado que en los pacientes con DM2 existe una reducción significativa de la secreción del GLP1. Mediante la infusión del GLP1, pero no del GIP, se puede conseguir restituir la respuesta insulínica en los pacientes con DM2, lo que sugiere un papel más relevante del GLP1 en la regulación de la secreción pancreática de insulina (102). A pesar de la importancia del papel del GLP1, su secreción no se considera actualmente como el defecto primario causante de la DM2, sino que parece ser una consecuencia de la hiperglucemia sostenida.

### **3.1. El GLP1 y el tejido óseo**

Algunos estudios han encontrado que el GLP-1 podría tener efectos positivos sobre el tejido óseo a través de propiedades antirresortivas y anabólicas, lo que sugiere efectos beneficiosos de los fármacos indicados para la DM2 como los análogos del receptor del GLP1 (GLP-1RAs) en el metabolismo óseo (103). Además se sabe que los osteoblastos y los osteoclastos expresan receptores para las hormonas incretinas GIP y GLP1 (104).

La acción del GLP1 y de los GLP1-RA sobre el tejido óseo ha sido determinada en estudios experimentales con animales o *in vitro*. Los ratones *knockout* para el receptor del GLP1 (GLP1-R) presentaban una reducción significativa de la fuerza, la rigidez y la calidad ósea, en comparación con los animales *wild-type*; mostraban además una menor madurez de la matriz de colágeno y alteraciones de las propiedades intrínsecas óseas. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cantidad mineral ósea. Probablemente sería el GLP1-R el que determinaría la resistencia y la calidad del tejido óseo (105).

Ma *et al.* en 2013 mostraron como la administración del análogo del receptor del GLP1, la exendina, a ratas ovariectomizadas tenía un efecto protector frente a la osteoporosis modulando el equilibrio entre resorción y formación óseas (106). En otro estudio más reciente se ha descubierto que la exendina produce un efecto anabólico sobre el tejido óseo, lo que sugiere que el GLP1-R participa en la diferenciación de células estromales de la médula ósea en osteoblastos (107).

Con respecto a los estudios disponibles de los efectos del GLP1 o los GLP1-RAs en humanos se ha encontrado un efecto positivo de estas moléculas sobre el hueso. En un estudio reciente realizado en hombres con sobrepeso u obesidad se demostró que las hormonas incretinas (GLP1 y GIP) suprimen el CTX y que la coinfusión de ambas tienen un efecto sinérgico disminuyendo aún más el CTX y como consecuencia inhibiendo la resorción ósea (108). En otro estudio las mujeres obesas que habían perdido peso después de seguir una dieta hipocalórica tenían una probabilidad cuatro veces menor de perder masa ósea si se trataban con liraglutida, y mostraban un aumento en el PINP pero sin cambios en el CTX en comparación con las mujeres no tratadas con este análogo del GLP1 (109).

Con respecto a la relación de los diferentes GLP1 RAs y el riesgo de fractura en pacientes con DM2 hay varios trabajos realizados.

En un metanálisis de 7 ensayos clínicos aleatorizados (ECA) se demostró que la utilización de exenatida y liraglutida no modificó el riesgo de fractura en pacientes con DM2 en comparación con el placebo u otros tratamientos antihiper glucemiantes (glimpirida, sitagliptina e insulina)(105).

En otro metaanálisis en 2013 de 16 ECA de duración variable (12 a 104 semanas) se estudió la asociación entre las fracturas óseas y los GLP1-RAs en general, y liraglutida o exenatida en particular. Se demostró que diferentes análogos del GLP1 tenían efectos contrarios sobre el riesgo de fractura osteoporótica (110) y un metaanálisis más reciente concluyó que solo dos análogos del GLP1, liraglutida y lixisenatida, redujeron el riesgo de fractura ósea y que su efecto dependía de la duración del tratamiento (111).

### ***3.2. El GLP2 y el tejido óseo***

El GLP2 es liberado también en respuesta a la ingesta de alimentos, y también ha sido objeto de muchos estudios en relación a su implicación en el tejido óseo; en el intestino estimula el trofismo de la mucosa y favorece la absorción de nutrientes (94) y su relación en el tejido óseo es objeto de numerosas investigaciones (91).

Los efectos del GLP2 en el tejido óseo han sido ampliamente estudiados en humanos. Los mecanismos moleculares subyacentes de su acción aún no se han

dilucidado (95), pero se ha propuesto la presencia de un receptor peptídico similar al glucagón-2 en algunas líneas celulares de osteoblastos que mostraron una mayor síntesis de osteocalcina en respuesta al GLP2 (112). En 2003 Henriksen *et al.* en un doble estudio realizado en voluntarios sanos, pusieron de manifiesto como la ingesta de una mezcla de nutrientes reducía la resorción ósea provocando una secreción en paralelo del GLP1 y GLP2. En el mismo estudio la inyección intravenosa del GLP2 a distintas dosis en 60 mujeres postmenopáusicas provocó una reducción de la resorción ósea y no modificó los parámetros de formación ósea (90). En un estudio posterior realizado por el mismo grupo se descubrió que la administración del GLP2 durante 14 días a mujeres posmenopáusicas sanas fue un tratamiento seguro que reducía significativamente la resorción ósea y no afectaba a la formación ósea, como se constató en los niveles de osteocalcina que permanecían estables durante el tratamiento (80). Un ensayo en 160 mujeres posmenopáusicas que recibieron tratamiento con el GLP2, en el día 120 tras la inyección se desencadenó un incremento en la densidad ósea en cadera y una reducción del incremento nocturno de la concentración del CTX, marcador de resorción ósea, mientras que no se modificó la osteocalcina, un marcador de formación ósea (113). Los osteoclastos expresan el receptor para el GLP2 (114) que inhibe la resorción ósea.

### **3.3. El GIP y el tejido óseo**

El GIP es secretado por las células K en el duodeno y el resto del intestino delgado en respuesta a la alimentación y comparte con el GLP1 la capacidad de estimular la liberación de insulina.

Los receptores del GIP (GIP-R) se expresan en el páncreas endocrino, intestino, cerebro, sistemas inmunitario y cardiovascular, pulmones, riñones, tiroides y el tejido adiposo. En el hueso el GIP-R se encuentra en células de linaje osteoblástico, así como en los osteoclastos (115). *In vitro* el GIP mejora la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, regula la maduración de colágeno y suprime la actividad de los osteoclastos (116). En un estudio de Xie *et al.* (117) se demostró por primera vez que los ratones *knockout* GIP-R presentaban alteraciones en el crecimiento óseo y en la DMO con una disminución en la masa ósea trabecular al mes de edad y a los 5 meses niveles más bajos de osteocalcina en suero en comparación con los controles de tipo salvaje. Además, los ratones *knockout* GIP-R

tuvieron cambios relacionados con la edad en la composición corporal antes que los ratones de tipo salvaje, incluida la masa ósea, la masa corporal magra y el porcentaje de grasa, y como consecuencia de estos hallazgos concluían que el GIP tiene un efecto anabólico sobre la masa y calidad ósea (117). En otro trabajo posterior se observó que los ratones *knockout* GIP-R tenían un peso corporal más bajo y un mayor volumen de hueso trabecular con marcadores de formación ósea aumentados y marcadores de resorción ósea disminuidos. Sin embargo, a pesar de un aparente aumento de la masa ósea, la calidad de la matriz ósea se redujo y en consecuencia la resistencia ósea (118).

En otro estudio realizado por Mabileau *et al.* en 2014 el tratamiento con el GIP exógeno en ratas disminuyó la pérdida ósea secundaria a la ooforectomía; no modificó la microarquitectura del hueso pero sí mejoró las propiedades del tejido en el hueso cortical y la mineralización y madurez del colágeno de la matriz ósea (119).

Como se ha visto, el efecto del GIP sobre el hueso se ha estudiado sobre todo en estudios preclínicos mostrando efectos beneficiosos a través de mecanismos antirresortivos como anabólicos; sin embargo, no se conoce bien su papel en el metabolismo óseo en humanos. Cabe destacar un estudio realizado en voluntarios sanos donde se demostró que la infusión del GIP reduce la resorción ósea, y una interacción con un posible efecto de hiperglucemia (120).

### **3.4. El péptido YY y el tejido óseo**

El péptido YY es producido por las células L en el íleon distal, colon y sigma y también aumenta tras la ingesta de comida, pero no se considera una hormona con efecto incretina. El precursor del péptido YY es producido por las células L en el íleon distal, colon y sigma. La escisión por la enzima DPP4 libera la forma circulante péptido YY<sub>3-36</sub> activo. La producción del péptido YY aumenta durante las comidas y suprime el apetito, por lo que limita el tamaño de la comida y con ello regula la ingesta de calorías (121).

En el cerebro, el péptido YY inhibe el efecto del neuropéptido Y al unirse al receptor Y2. Los pacientes con anorexia tienen niveles elevados del péptido YY en

suero. In vitro, el péptido YY activa una vía de señalización en osteoblastos que expresan el receptor Y1.

Los ratones con deficiencia del péptido YY presentan un peso corporal y un crecimiento similar a los ratones de tipo salvaje hasta las 14 semanas de edad. Los efectos de la eliminación del péptido YY son controvertidos. En un estudio los ratones *knockout* péptido YY tenían una DMO total más baja con una marcada disminución en la masa ósea trabecular en comparación con los ratones de tipo salvaje, en ambos sexos y en edades que iban de 2 a 9 meses (122). Sin embargo, también se ha informado que la deficiencia del péptido YY aumenta la masa ósea en ratones machos y hembras como resultado de un efecto estimulante de los osteoblastos. Las mujeres con sobreexpresión del péptido YY tienen huesos más pequeños y una masa ósea más baja con una disminución en la formación de hueso y un aumento en la resorción ósea.

### **3.5. La enzima DPP4 y el tejido óseo**

La enzima DPP4 es una enzima ubicua expresada en la superficie de las mayoría de los tipos de células que desactiva una variedad de otros péptidos bioactivos, incluidos el GIP y el GLP1 (123). Los inhibidores de la DPP4 (IDPP4) son fármacos que inhiben la enzima DPP4, actualmente utilizados principalmente en el campo de la DM2 (123). Se ha estudiado su efecto sobre la osteoporosis y el riesgo de fractura en pacientes con DM2 en diferentes estudios.

En un metaanálisis que incluyó 28 ensayos se encontró un riesgo del 40% menor de fracturas en pacientes tratados con inhibidores de la DPP4 en comparación con placebo u otros tratamientos antihiper glucémicos. El papel neutral de los inhibidores de la DPP4 en el metabolismo óseo se demostró mediante el tratamiento con vildagliptina en pacientes con DM2 sin tratamiento farmacológico durante un año. Los niveles circulantes de marcadores de resorción ósea y la homeostasis del calcio no se vieron afectados en comparación con el valor inicial y con el placebo (124).

Recientemente se ha examinado la incidencia de fracturas entre los participantes del ensayo clínico que evaluó los resultados cardiovasculares con



sitagliptina (TECOS). Durante el seguimiento de 43 222 años- personas, 375 pacientes (2.6%; 8.7 por 1 000 años-persona) tuvieron una fractura. Se concluyó que las fracturas fueron frecuentes en las personas con DM2 en el estudio TECOS, pero que no estaban relacionadas con el tratamiento con sitagliptina. El tratamiento con insulina y metformina se asoció con un mayor y menor riesgo de fractura, respectivamente (125).

#### **4. Alimentos, nutrientes y su relación con el tejido óseo**

La formación del hueso durante el desarrollo y el mantenimiento durante la edad adulta están bajo la influencia de factores ambientales, entre los que los factores mecánicos y los nutricionales juegan un papel fundamental. La alimentación proporciona nutrientes que pueden afectar a la salud ósea. Los nutrientes que influyen de manera más decisiva, a través de mecanismos específicos en el hueso a lo largo de la vida, son el calcio, la vitamina D, el fosfato inorgánico y las proteínas (126). Una alimentación desequilibrada y un estilo de vida poco saludable pueden dar lugar a la falta de estos nutrientes que tan importantes son para el esqueleto (127).

Como es lógico, se eligen y se consumen alimentos en lugar de nutrientes. Por lo tanto parece lógico que el estudio de la relación entre los factores nutricionales y la osteoporosis sea a través de encuestas alimentarias que puedan proporcionar recomendaciones alimentarias relacionadas con la DMO y el riesgo de fracturas (128).

##### **4.1. Macronutrientes y principales grupos de alimentos**

Las proteínas se consideran como un nutriente esencial para la síntesis de colágeno en los huesos (129). Un metaanálisis de estudios transversales sugiere que no existe asociación o escasa asociación positiva entre la ingesta de proteínas y la DMO (130). Se sabe que una ingesta adecuada de proteínas (aprox. 0.8 g/kg) disminuye el riesgo de pérdida ósea en pacientes que han tenido una fractura de cadera (131). En otro estudio los pacientes que recibieron suplementos proteicos después de sufrir una fractura de cadera tuvieron estancias hospitalarias más cortas y mejor recuperación funcional (132).

Con respecto a la grasas se ha demostrado que la ingesta total de grasas y más específicamente la ingesta de grasa saturada se asocia con un mayor riesgo de pérdida ósea y fracturas osteoporóticas (133). Sin embargo, también se ha informado de la acción beneficiosa de la alta ingesta de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), con una menor incidencia de fractura (134). Una alimentación con una relación baja de AGP omega-6/omega-3 en la juventud da lugar a un pico alto de DMO. Por el contrario, una alimentación con una relación elevada de AGP omega-6/omega-3 se asocia con menor densidad ósea en cadera en adultos mayores de 45 años (135).

En líneas generales se sabe que una alimentación caracterizada por el alto consumo de cereales refinados, carnes procesadas, alimentos fritos y dulces se asocia de forma negativa con el hueso. Estos alimentos se relacionan con el aumento de los niveles de inflamación (aumento de los marcadores inflamatorios), lo que parece tener un impacto negativo en la calidad del hueso (136)(137). Por otro lado, una alimentación basada en altas cantidades de frutas y verduras ha mostrado una relación positiva con la salud del esqueleto (136). Los mecanismos específicos no se conocen claramente, aunque se sugiere que el posible efecto positivo sobre el hueso está relacionado con la propiedad alcalinizante y la presencia de compuestos bioactivos (tales como antioxidantes) en la composición de estos alimentos (137).

Los productos lácteos son de particular interés en el impacto de los alimentos sobre la salud ósea. Contienen nutrientes que incluyen el calcio, el fosfato inorgánico y las proteínas en cantidades superiores a las cantidades recomendadas. El efecto beneficioso de estos tres nutrientes en la formación y en la mineralización de la matriz orgánica ósea y el efecto inhibitor sobre la resorción ósea ha sido bien documentado (138)(139). Dentro de los lácteos, el yogur tiene un valor nutricional alto, ya que aporta una buena cantidad de calcio, vitaminas del grupo A y B y diferentes minerales. Además, si se compara con la leche, el yogur aporta mayor cantidad de calcio y proteínas de alto valor biológico (140).

Las frutas y las verduras son excelentes fuentes de varios micronutrientes (como el calcio, vitamina K, vitamina C, ácido fólico, magnesio, potasio entre otros) y compuestos bioactivos pero su papel en la salud ósea sigue sin estar claro (127). Una revisión sistemática realizada por Hamidi *et al.* (141) sobre la ingesta de frutas y

verduras y la salud ósea en mujeres mayores de 45 años no encontró una asociación clara entre este grupo de alimentos y el metabolismo óseo o el riesgo de fracturas. Por el contrario, estudios más recientes han mostrado que el aumento en la ingesta de frutas y verduras tiene efectos positivos sobre la densidad ósea y podrían disminuir el riesgo de fracturas (142).

#### **4.2. Importancia del calcio, fósforo y vitamina D en el metabolismo óseo**

Como se ha mencionado previamente, los principales factores nutricionales para prevenir la osteoporosis son el calcio, el fósforo y la vitamina D, ya que participan de forma activa en la formación del hueso (126).

El calcio y el fósforo representan los dos minerales principales que forman los cristales de hidroxapatita del hueso. Aproximadamente el 85% del fósforo del cuerpo se encuentra en el hueso. El fosfato es abundante en la mayoría de los alimentos, especialmente en los alimentos procesados y en los refrescos (143).

El calcio aportado por la dieta es fundamental para conseguir una correcta mineralización del hueso y mantener la densidad y la microarquitectura ósea. Una ingesta insuficiente de calcio da lugar a un pico de masa ósea subóptima y una baja mineralización, lo que puede conducir a la osteoporosis y a las fracturas en consecuencia (126). En líneas generales se recomienda el aumento del consumo de calcio a través de la alimentación (o si es necesario con suplementos) hasta alcanzar en total un aporte de 1 000-1 200 mg diarios (144).

La vitamina D es también un factor importante para mantener la salud ósea. La vitamina D interviene en la absorción intestinal de calcio e interactúa con la hormona paratiroidea para mantener la homeostasis del calcio (126). Resulta complicado, incluso teniendo una alimentación saludable, conseguir una ingesta de vitamina D mayor de 200 UI/día, cuando la cantidad que tiende a recomendarse en la actualidad en personas mayores de 50 años oscila entre 800 y 1 000 UI diarias (126)(140). Las fuentes alimenticias de vitamina D incluyen los pescados grasos de agua salada, hígado, yema de huevo, margarina, algunos yogures, quesos, cereales y leche fortificada con vitamina D entre otros. Sin embargo, la vitamina D o colecalciferol

está presente solo en pequeñas cantidades en los alimentos y se produce principalmente en la piel tras la exposición a la radiación ultravioleta B (126).

La vitamina D o colecalciferol se activa a través de dos hidroxilaciones sucesivas, la primera ocurre en el hígado por la enzima 25-hidroxilasa, y se forma el 25-hidroxivitamina D o calcidiol; este metabolito es la principal forma circulante de la vitamina D y se considera el marcador del estado corporal de vitamina D (143). La segunda hidroxilación ocurre a nivel renal por la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa, y se origina el 1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol, que es el metabolito natural más activo (145).

En el intestino el calcitriol estimula la absorción de calcio y fósforo. En el riñón estimula la reabsorción renal de calcio. Sobre el hueso el calcitriol ejerce un efecto inhibitor de la resorción ósea (146).

#### **4.3. Otros nutrientes y su influencia sobre el metabolismo óseo**

##### **a) La vitamina K**

La vitamina K es mejor conocida por sus funciones en la coagulación sanguínea, pero también tiene su importancia en el metabolismo óseo. La vitamina K es un cofactor de la  $\gamma$ -carboxilasa y es esencial para la  $\gamma$ -carboxilación de la osteocalcina, una de las principales proteínas de la matriz ósea no colágena que tiene un papel muy importante en la mineralización ósea. Sin embargo, la osteocalcina subcarboxilada carece de integridad estructural y su capacidad para unirse a la hidroxiapatita se ve afectada (147).

Existen dos formas naturales de vitamina K: la filoquinona (K1) es la forma dietética principal (especialmente se encuentra en las verduras de hoja verde), mientras que la menaquinona-4 (K2) es la forma predominante de vitamina K en el organismo. La vitamina K2 es sintetizada por las bacterias intestinales, pero también está presente en algunos alimentos (queso, cuajada, etc.)(143)(148).

Los estudios observacionales sugieren que las dietas bajas en vitamina K se asocian con un mayor riesgo de fracturas en los ancianos (149). Un ECA en 2006 no encontró ningún efecto sobre el recambio óseo con la leche fortificada con calcio

más vitamina K que sin ella, pero el estudio duró menos de 4 meses y sólo evaluó los marcadores de recambio óseo en mujeres premenopáusicas jóvenes (150). Otro ECA posterior incluyó a mujeres posmenopáusicas que consumieron productos lácteos enriquecidos con calcio y vitamina D, con y sin vitamina K (151). Después de 1 año se produjeron aumentos significativos en la DMO corporal total en todos los grupos de tratamiento; se observaron mayores aumentos en la DMO de la columna sólo en los grupos que consumieron vitamina K. Actualmente no existe suficiente información para considerarla como parte del tratamiento y prevención de la osteoporosis (4).

#### b) Los fitoestrógenos

Los fitoestrógenos se encuentran en algunos alimentos vegetales, sobre todo las isoflavonas de la soja. Imitan la acción de los estrógenos y son una alternativa terapéutica a los mismos. En varios estudios han demostrado prevenir la pérdida ósea pero aun no hay datos concluyentes de que estos nutrientes aumenten la DMO o disminuyan el riesgo de fracturas (4)(152).

#### c) Potasio

La ingesta alta o los suplementos de potasio mejoran el balance del calcio y reducen a corto plazo la resorción ósea, pero se desconocen sus efectos a largo plazo (140).

#### d) La vitamina A

La ingesta excesiva y crónica de vitamina A (es decir, más 10 000 UI diarias) debe evitarse, ya que ha demostrado que tiene efectos perjudiciales para el hueso (153).

#### e) La sal

La ingesta de sal se asocia con un aumento en la pérdida urinaria de calcio. Una dieta elevada de sodio provoca un aumento significativo de la resorción ósea en las mujeres postmenopáusicas, por lo que es importante limitar la ingesta de sodio a < 5-6 g/día y evitar sobre todo los alimentos preparados (140).

f) El alcohol

Se ha observado que las personas que abusan del alcohol tienen niveles bajos de masa ósea que suelen mejorar al abandonar su consumo (154).

g) La cafeína

Moderar el consumo de cafeína puede tener un efecto beneficioso, porque la ingesta de cafeína da lugar a una disminución de la absorción de calcio y un aumento de la excreción urinaria del mismo (4)

Por último cabe destacar que el tabaquismo ha demostrado ser un factor negativo sobre la masa ósea que favorece su pérdida y por ello debe evitarse. El tabaquismo parece disminuir la absorción de calcio y aumenta su excreción urinaria (140).

## **5. Indicaciones actuales de las hormonas gastrointestinales estudiadas**

El papel de las hormonas incretinas en el tratamiento de la DM2 ha adquirido recientemente mucho interés por la acción beneficiosa de estas moléculas sobre los islotes pancreáticos (155). Dentro de las terapias basadas en el efecto incretina se engloban dos tipos de fármacos: los GLP1-RAs y los IDPP4. También se han identificado como objetivos terapéuticos en el campo de la obesidad (156).

Así tanto los GLP1-RAs (157)(158) como los IDPP4 (159) podrían influir en el riesgo de fracturas, aunque con resultados no concluyentes.

### **a) Los IDPP4**

Los fármacos IDPP4 actúan bloqueando el enzima que convierte en inactiva la molécula del GLP1. De esta manera aumenta la vida media, y con ello la concentración del GLP1 propio.

Hoy en día existen en nuestro país cuatro moléculas de esta familia comercializadas para su uso en pacientes con DM2: sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina y linagliptina (160).

La mayoría de las guías de las principales sociedades científicas recomiendan el uso de esta familia de fármacos en pacientes con DM2 en segundo o tercer escalón terapéutico cuando las sulfonilureas están contraindicadas o no toleradas, o bien cuando existe un riesgo elevado de hipoglucemia (160).

El reciente consenso español de tratamiento de la DM2 en el paciente anciano recomienda el uso de los IDPP4 tras la metformina como fármaco de elección en este subgrupo de pacientes (161).

### **b) Los GLP1 RAs**

Los análogos reproducen las acciones de esta hormona al tener una afinidad comparable por el receptor del GLP1, y son resistentes a la degradación de la enzima DPP4. En nuestro país se encuentran comercializadas las siguientes moléculas: exenatida, liraglutida y lixisenatida, y dulaglutida y semaglutida de administración semanal (162).

Además la liraglutida (saxenda) también está indicada en el tratamiento en pacientes con obesidad, sin DM2, con resultados muy favorables. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos para nuevas indicaciones de estos péptidos en la obesidad (163).

Los GLP1 RAs son fármacos de administración parenteral (vía subcutánea) que pueden añadirse a partir del segundo escalón de tratamiento en pacientes con DM2 que reciben otras familias de antidiabéticos (metformina, glitazonas, sulfonilureas e insulina basal en doble o triple terapia)(162).

### **c) Los análogos del receptor GLP2 (GLP2 RAs)**

El GLP2 RA (teduglutida) está indicado actualmente para el tratamiento del síndrome de intestino corto dependiente de nutrición parenteral domiciliaria. Este fármaco consigue mejorar la absorción de líquidos y energía, disminuye las pérdidas fecales y las necesidades de la nutrición parenteral, incluso no es necesaria en algunos casos mientras se administra el fármaco. Se ha demostrado que el tratamiento con teduglutida ha permitido la reducción del volumen y del número de

días de la nutrición parenteral y mantiene estable la ingesta de líquidos orales, la diuresis y el peso corporal (164)(165).

Con todo lo anteriormente expuesto se ha demostrado que después de la ingesta de alimentos la resorción ósea se reduce y al parecer este proceso está mediado por hormonas gastrointestinales liberadas después de la ingesta de comida como son las hormonas con efecto incretina. Apoya esta hipótesis la observación de que la alimentación parenteral se asocia con la reducción de la masa ósea y lo que sugiere que un déficit de las hormonas incretinas podría tener un cierto papel en el proceso de remodelación ósea. Algunos estudios han encontrado que el GLP1 y otras hormonas incretinas, como el GLP2 o el GIP, podrían tener efectos positivos sobre el hueso a través de propiedades antiresortivas y anabólicas, lo que sugiere efectos beneficiosos de fármacos antidiabéticos como los GLP-1RAs o los IDPP-4 en el metabolismo óseo. Estos parecen implicar en los mecanismos de acción el sistema Wnt/ $\beta$ catenin, la relación de OPG/RANKL y los niveles de esclerostina (166).

## **6. Justificación**

La osteoporosis y las fracturas osteoporóticas conforman una entidad clínica de gran importancia debido a su gran prevalencia, sus altas cifras de morbilidad y mortalidad. Esto conlleva un alto impacto económico a nivel socio-sanitario, repercute de forma importante en la calidad de vida del paciente, por lo que se la considera como un verdadero problema de salud pública en los países desarrollados.

Se ha demostrado que existe una relación funcional entre el intestino y el tejido óseo, demostrada entre otros hallazgos por la reducción de la resorción ósea tras la ingesta de alimentos o la reducción de la masa ósea en pacientes en tratamiento con nutrición parenteral, y al parecer los responsables son determinadas hormonas gastrointestinales que responden a la ingesta de nutrientes con efectos beneficiosos sobre el metabolismo óseo (91). Esto a su vez sugiere que algunos fármacos basados en estas hormonas, ya comercializados e indicados en otras enfermedades, podrían tener efectos positivos sobre el hueso, como es el caso de los GLP1 RAs o los IDPP4, actualmente indicados en el tratamiento de la DM2 o los GLP2 RAs, recomendados en el síndrome de intestino corto.



Supone en la actualidad un reto muy importante ampliar el arsenal terapéutico de la osteoporosis con la finalidad de prevenir su principal complicación que son las fracturas. Por tanto es necesario seguir indagando en la relación tejido óseo-intestino para conocer la interacción entre determinadas hormonas gastrointestinales sobre el tejido óseo, y su impacto en la mejoría de la densidad mineral ósea con la consecuente disminución de la incidencia de fracturas osteoporóticas.

Por lo anteriormente expuesto se considera que es necesario profundizar en el conocimiento de la relación de determinados péptidos intestinales con el metabolismo óseo, concretamente en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, con la finalidad de apoyar y demostrar nuevos datos que confirmen esta relación. Aunque sí se ha demostrado una relación entre el GLP2 y la enzima DPP4 con la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas no diabéticas, hay pocos estudios sobre la asociación del GLP1 con la osteoporosis en humanos sin trastorno del metabolismo de la glucosa. La confirmación de esta relación sería de gran interés, especialmente en relación con el GLP1, porque los fármacos basados en estos péptidos que se utilizan en la diabetes mellitus podrían tener un valor potencial en el tratamiento de la osteoporosis.

Por este motivo se comenzó nuestro trabajo con el objetivo principal de conocer la relación de determinadas hormonas gastrointestinales con la osteoporosis.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1. Hipótesis**

En mujeres postmenopáusicas con osteoporosis, los niveles de péptidos intestinales, principalmente el GLP1, el GLP2 y el péptido YY, están disminuidos en comparación con las mujeres postmenopáusicas sin osteoporosis de la misma edad.

#### **2. Objetivos**

##### **2.1. Principal**

Determinar si los péptidos intestinales, el GLP1, el GLP2 y el péptido YY, así como la enzima encargada de la metabolización de estos péptidos, la DPP4 se relacionan con la osteoporosis.

##### **2.2. Secundarios**

a) Estudiar la ingesta de los principales grupos de alimentos (lácteos, verduras y hortalizas, legumbres, frutas, carnes, pescado y huevos, aceites) y su asociación con la osteoporosis y con los péptidos referenciados anteriormente: GLP1, GLP2, péptido YY y la enzima DPP4.

b) Evaluar la ingesta de los macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) y de micronutrientes (calcio, zinc, vitamina C, vitamina B12, ácido fólico, vitamina B6 y vitamina D) y su relación con la osteoporosis y con los péptidos intestinales: GLP1, GLP2, péptido YY y la enzima DPP4.

c) Comprobar si los siguientes parámetros antropométricos: peso, talla e índice de masa corporal (IMC) se asocian con los péptidos intestinales estudiados y con la osteoporosis.

d) Indagar en los parámetros sanguíneos que intervienen en el remodelado óseo y su asociación con la osteoporosis y con los péptidos intestinales GLP1, GLP2, péptido YY y la enzima DPP4, especialmente los siguientes: calcio corregido por albúmina, fósforo, magnesio, vitamina D, parathormona, P1NP y CTX.

e) Investigar si otros parámetros sanguíneos se relacionan con la osteoporosis: hemograma, glucosa basal y hemoglobina glicosilada (HbA1c), urea, creatinina, colesterol total y fracciones, triglicéridos, ácido úrico, TSH, ácido fólico, vitamina B12 y albúmina.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **1. Diseño del estudio**

Estudio de casos y controles, realizado en mujeres postmenopáusicas con y sin osteoporosis que viven en la comunidad, emparejados 1:1 por edad (+/- 1 año).

### **2. Tamaño de muestra**

Se ha calculado a partir de los resultados para el GLP2 en el trabajo de Wojcik *et al.* (167); según estos resultados si se considera un error  $\alpha$  del 5%, una potencia del 90% y un 10% de pérdidas, para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  mediante una prueba t-Student bilateral para dos muestras independientes, y asumiendo que la media de los niveles del GLP2 del grupo de los casos ( $\pm$  error estándar de la media, EEM) es de 92.20 ( $\pm$  10.5) pg/mL y la del grupo de los controles (EEM) es de 106.30 ( $\pm$  11.6) pg/mL, se necesitarían 38 pacientes en el estudio.

Para salvar las diferencias que existe entre el estudio de Wojcik y el presente y para poder llevar a cabo los análisis estadísticos planteados con suficiente potencia estadística, se ha decidido ampliar la muestra hasta un total de 43 casos y 43 controles.

El procedimiento de muestreo utilizado ha sido de forma consecutiva a la identificación de los pacientes.

### **3. Población de estudio**

La población del estudio corresponde al área de influencia del Hospital Universitario de Jaén. Los participantes fueron voluntarios que acudían a consultas externas de diferentes especialidades del Hospital de Jaén desde enero de 2015 hasta enero de 2016 y que a priori cumplían los criterios de inclusión. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Complejo Hospitalario de Jaén. Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron a participar y firmaron un consentimiento informado.

### 3.1. Grupo de casos

Las participantes fueron mujeres con osteoporosis diagnosticadas mediante medición de masa ósea por absorciometría dual por rayos X (DEXA).

#### 3.1.1. Criterios de inclusión

- Mujeres postmenopáusicas con edad menor 70 años. El estado postmenopáusico es definido por la presencia de amenorrea durante más de un año.
- Diagnosticados de osteoporosis mediante masa ósea por DEXA, definida por una DMO con valor  $T\text{-score} \leq -2.5$  DE, medida en columna lumbar y cuello femoral.
- Ausencia de diagnóstico de DM2 o prediabetes (según datos de HbA1c y glucosa basal en ayunas) de acuerdo con los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2020)(168).

#### 3.1.2 Criterios de exclusión:

- Diagnóstico de osteoporosis secundaria (4).
- Hospitalización durante los 6 meses previos.
- Diagnóstico de cáncer avanzado.
- Diagnóstico de enfermedad íleo-cólica (enfermedad inflamatoria intestinal, malabsorción intestinal y resección/ fistula intestinal).
- Diagnóstico de enfermedad renal crónica estadio IV: *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD-4) medida por tasa de filtración glomerular (TFG)  $< 30$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> (169).
- Tratamiento activo con: factores biológicos; fármacos antidiabéticos, incluyendo los inhibidores de la DPP4 o los análogos del GLP1 y GLP2; colestiramina; anticonvulsivantes; rifampicina; antiácidos; antineoplásicos; corticoides; inhibidores de la bomba de protones; litio; inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina; heparina; o fármacos antiosteoporóticos (4).

### 3.2. Grupo de controles

Mujeres sanas, voluntarias que acudían a consultas externas de diferentes especialidades.

### **3.2.1. Criterios de inclusión**

Mujeres con edad menor de 70 años, y que no hayan sido diagnosticadas de osteoporosis ni de osteopenia, medida por densitometría y que no hayan presentado fractura por fragilidad, emparejados por edad ( $\pm 1$  año) con el grupo de casos.

### **3.2.2. Criterios de exclusión**

Los mismos que los expuestos

## **4. Determinación de parámetros antropométricos**

A todas las pacientes que participaron en el estudio se les determinó el peso (kg), la talla (cm) y el IMC (expresado  $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

## **5. Determinación de masa ósea**

A todas las participantes se les realizó una densitometría (mediante densitómetro marca GE HC, modelo: LUNAR DPX) en columna lumbar (vértebras L1-L4) y en cuello femoral izquierdo. Se determinaron el *T-score* y el *Z-score*. Se consideró osteoporosis en función del *T-score*, cuando los valores de DMO fueron igual o menor de -2.5 DE ( $T\text{-score} \leq -2.5$ ), medidas en una o en las dos localizaciones.

## **6. Determinaciones analíticas**

Se realizaron dos extracciones sanguíneas: basal, en ayunas de al menos 8 horas, para la determinación de parámetros de metabolismo óseo y bioquímica general, y la segunda el mismo día pero en período postprandial para la determinación de los péptidos; se determinaron los péptidos en periodo postprandial dado que en condiciones de ayuno los niveles son muy bajos y se midieron tras la ingesta de un preparado nutricional completo (aportando carbohidratos, proteínas y lípidos), con formulación químicamente definida (*Resource HP/HC®*, Nestlé Health Science) (ver composición en anexo 2), con el fin de conseguir una ingesta totalmente homogénea en todos los voluntarios. La extracción sanguínea se realizó a los 30 minutos de dicha ingesta.

6.1. Parámetros del metabolismo óseo y bioquímica general: En el laboratorio de análisis clínicos del Hospital de Jaén se analizaron los parámetros de metabolismo y remodelado óseo: calcio, fósforo y magnesio séricos (mg/dl), 25-hidroxivitamina D (ng/ml), PTH (pg/ml), osteocalcina (ng/ml), P1NP (ng/ml) y CTX (ng/ml), así como hemograma y bioquímica general incluyendo: glucosa basal (mg/dl), HbA1c (%), urea (mg/dl), creatinina (mg/dl), colesterol total y fracciones (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), ácido úrico (mg/dl), TSH (mUI/L), ácido fólico (ng/mL), vitamina B12 (ng/mL) y albúmina sérica (g/dl).

6.2. Determinación de péptidos intestinales: Las determinaciones del GLP1 (pg/ml), GLP2 (pg/ml) y péptido YY (pg/ml), se realizaron en el laboratorio de fisiología de la Universidad de Jaén. Las muestras de plasma fueron obtenidas a partir de sangre extraída en situación postprandial, de la vena antecubital. Los tubos se colocaron en hielo y se centrifugaron inmediatamente a 4°C, y a 3 000 x g, 30 minutos, guardándose inmediatamente después en un congelador a -80°C. Antes de la extracción sanguínea y solo en el tubo con la muestra de sangre correspondiente al estudio de los péptidos se añadió 10 µL de un inhibidor de la DPP4 (DPP4/DPP4-010, *Linco Research Inc. St. Charles, Missouri, EEUU*) por cada mL de sangre, según la técnica de Hattori *et al* (170). Para las determinaciones se utilizaron el *Kit Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-Plex Assay*, de *Bio-Rad*, específicamente diseñado para la determinación de los niveles del GLP1, GLP2, péptido YY, con técnicas de ELISA mediante kits comerciales de la marca BIONOVA®.

6.3. Determinación de la actividad DPP4: La actividad DPP4 se determinó por técnicas fluorimétricas con el Kit de ensayo de la actividad DPP4 de Sigma-Aldrich. Este ensayo se basa en la hidrólisis por parte del enzima del sustrato H-Gly-Methoxy-β-Naphtylamida, liberándose el producto 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) cuya fluorescencia se medirá a una excitación de 345 nm y una emisión de 412 nm tras la incubación a 37°C.

## **7. Encuesta alimentaria**

Se utilizó un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario semicuantitativo validado en la población española, el utilizado en el estudio de la cohorte SUN (171)(172). Se recoge información de frecuencia de consumo en

función del tipo de alimento (diario, semanal, mensual y anual) del año anterior. Se determinó la ingesta por día de energía [kilocaloría (kcal)/día], macronutrientes (carbohidratos, proteínas y lípidos) en gramos/día, y micronutrientes: calcio, fósforo, zinc, vitamina D, vitamina C, vitamina B12 y ácido fólico.

## **8. Resumen de las variables**

### **8.1. Descriptivas**

Edad (años); situación laboral (en activo, jubilado o desempleado, y ama de casa); hábitos tóxicos: tabaco, cigarrillos/día (cig/d) (no fumador, 1-4 cig/d, 5-10 cig/d, más de 10 cig/d o sin respuesta); alcohol (no alcohol, ocasional o menos 10 g/día).

### **8.2. Antecedentes personales y tratamientos farmacológicos**

Se revisaron todos los antecedentes personales y la medicación farmacológica de los participantes, con valoración de los medicamentos incluidos en los criterios de exclusión.

### **8.3. Determinaciones analíticas**

#### **8.3.1. Específicas**

##### **8.3.1.1: Péptidos intestinales**

- GLP1 (pg/ml)
- GLP2 (pg/ml)
- Péptido YY (pg/ml)
- Actividad de la DPP4: la actividad se expresará como  $\mu\text{mol}$  de AMC por minuto y por mL de plasma.

##### **8.3.1.2: Parámetros del metabolismo y remodelado óseo:**

- Calcio sérico (mg/dl)
- Fósforo sérico (mg/dl)
- Magnesio sérico (mg/dl)
- PTH (pg/ml)



- 25-hidroxivitamina D (ng/ml)
- Osteocalcina (ng/ml)
- P1NP (ng/ml)
- CTX (ng/ml)

### **8.3.2. Generales**

- Hemograma: hematíes, leucocitos y plaquetas (unidades/L)
- Bioquímica estándar: glucosa (mg/dl), HbA1c (%), urea (mg/dl), creatinina (mg/dl), colesterol (total y fracciones) (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), ácido úrico (mg/dl), TSH (mUI/L), ácido fólico (ng/mL), vitamina B12 (ng/mL) y albúmina sérica (g/dl).

### **8.4. Masa ósea**

- Columna lumbar (vértebras L1 a L4)
- Cuello femoral izquierdo

### **8.5. Parámetros antropométricos:**

- Peso (kg)
- Talla (cm)
- IMC ( $\text{kg/m}^2$ )

### **8.6. Ingesta alimenticia**

- Ingesta de los principales grupos de alimentos (lácteos, verduras y hortalizas, legumbres, frutas, carnes, pescado y huevos, aceites) (g/día).
- Energía (kcal/día).
- Macronutrientes: carbohidratos (g/día), proteínas (g/día) y lípidos (g/día).
- Micronutrientes: calcio (mg/día), fósforo (mg/día), vitamina D (mg/día), zinc (mg/día), vitamina C (mg/día), vitamina B12 ( $\mu\text{g/día}$ ), vitamina B6 ( $\mu\text{g/día}$ ) y ácido fólico ( $\mu\text{g/día}$ ).

## 9. Análisis de los datos

Los datos recogidos sobre las variables dependientes e independientes mencionadas en este estudio se registraron en una base de datos anonimizada, construida para tal fin y procesadas estadísticamente mediante el programa estadístico Stata MP 16.1 para Windows (*College Station, TX, EEUU*).

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables de la base de datos, para ello en el caso de las variables cualitativas se presenta una tabla de frecuencias y como representación gráfica el gráfico de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se presentan medidas de tendencia central y como representación gráfica el diagrama de caja.

Para comprobar la relación entre los péptidos intestinales y la presencia de la osteoporosis y el resto de variables se utilizaron varios test. En el caso de una variable cualitativa dicotómica y una variable cuantitativa se aplicó el t- test o t de Student para muestras independientes o el test no paramétrico U-Mann Whitney. Si la variable cualitativa tiene más de dos categorías se realizó el análisis ANOVA o el test no paramétrico de Kruskal Wallis. En el ANOVA para las comparaciones múltiples se utilizó el método de Bonferroni.

En el caso de variables cualitativas se utilizó el test ji-cuadrado (en tablas r x s), el test de Fisher (en tablas 2x2) y la odds ratio y su intervalo de confianza.

En el análisis multivariable se ha utilizado la regresión logística para determinar las variables que se asocian con la presencia o no de la osteoporosis. Se consideraron como factores de confusión los que no sean variables intermedias entre la exposición y el efecto, y mantengan una relación con la exposición (GLP1, GLP2, péptido YY) y el efecto (osteoporosis). Como criterio pragmático se utilizó en la detección de un factor de confusión el cambio en el coeficiente del modelo de regresión logística en un 10% o más. Para todos los análisis se consideró significativo un valor  $\alpha=0.05$ .

## V. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis descriptivo. La edad media (EEM) fue de 58.7 (0.6) años para los casos y 58.8 (0.6) años para los controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles en la situación laboral o los antecedentes de hábitos tóxicos (tabaco y alcohol). En la tabla 2 se representan los antecedentes de enfermedad y tratamientos farmacológicos, y tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados del análisis de comparación de medias de parámetros alimenticios: principales grupos de alimentos y los macro y micronutrientes, y su relación con la osteoporosis. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En la tabla 5 se muestran los datos antropométricos y de densitometría ósea y su relación con la osteoporosis. Se observa como los valores de peso e IMC fueron significativamente más bajos ( $p < 0.001$ ) en los casos que en los controles. Respecto a los valores de la DEXA, como era de esperar, los casos y controles diferían significativamente ( $p < 0.001$ ).

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados del test de comparación de medias de los valores de los péptidos intestinales estudiados (GLP1, GLP2, péptido YY y actividad de DPP4) y de los parámetros sanguíneos que intervienen en el remodelado óseo entre casos y controles. Se observaron niveles significativamente más bajos ( $p < 0.001$ ) del GLP1 en los casos (media [EEM] = 116.75 [2.68]) que en los controles (media [EEM] = 126.79 ± 2.68). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los niveles plasmáticos del GLP2, péptido YY, DPP4, ni en los parámetros del remodelado óseo: calcio sérico corregido con albúmina, fósforo, magnesio, 25-hidroxivitamina D y PTH. Conforme a lo esperado, los casos y controles difirieron significativamente ( $p < 0.001$ ) en los marcadores de remodelado óseo (osteocalcina, PINP y CTX).

En la tabla 8 se muestran los resultados del test de comparación de medias en los parámetros hematimétricos y de bioquímica general entre casos y controles. La

glucemia basal se mostró ligeramente más baja en las pacientes que tenían osteoporosis (media [EEM] =  $89.55 \pm 1.51$ ) en comparación con las mujeres sin osteoporosis (media [EEM] =  $94.302 \pm 1.51$ ) con un resultado estadísticamente significativo ( $p = 0.028$ ).

En la tabla 9 se detallan los resultados del análisis de regresión lineal para niveles del GLP1, GLP2, péptido YY y DPP4, con los marcadores de remodelado óseo. Se observa una correlación positiva entre el GLP1 y el CTX que fue significativa en el grupo de los casos ( $p = 0.011$ ) y cercana a la significación en el de los controles ( $p = 0.054$ ), y una correlación negativa significativa entre el GLP1 y el PINP en los controles ( $p = 0.043$ ). El GLP2 también se correlacionó positivamente con la osteocalcina en los controles ( $p = 0.04$ ). La DPP4 se correlacionó positivamente con el PINP ( $p < 0.001$ ) y el CTX ( $p = 0.022$ ) en los controles.

En las tablas 10 y 11 se representan los resultados del análisis de regresión lineal del GLP1 con los principales grupos de alimentos y nutrientes. El GLP1 se relacionó significativamente y de forma negativa ( $p = 0.004$ ) con la ingesta de cereales integrales.

En las tablas 12 y 13 se muestran la relación del GLP2 con los principales grupos de alimentos y nutrientes (análisis de regresión lineal). El GLP2 se vinculó significativamente y de forma negativa con la ingesta de carbohidratos ( $p = 0.04$ ) y de forma positiva con los niveles de AGM ( $p = 0.01$ ).

En las tablas 14 y 15 se representan los valores del péptido YY con los principales grupos de alimentos y nutrientes (análisis de regresión lineal). El péptido YY se asoció negativamente con los AGM y el consumo de aceite de oliva de forma significativa,  $p = 0.02$  y  $p = 0.004$ , respectivamente.

En las tablas 16 y 17 se muestran la relación de la enzima DPP4 con los principales grupos de alimentos y nutrientes (análisis de regresión lineal). La enzima DPP4 se relaciona de forma positiva y significativa con la ingesta de AGP omega 6 ( $p = 0.043$ ) y los niveles de vitamina C ( $p = 0.048$ ) y de forma negativa con los AGP ( $p = 0.018$ ).

Finalmente en la tabla 18 se muestran los resultados del análisis de regresión logística condicional cruda y ajustada sobre la relación de la presencia de osteoporosis con los péptidos intestinales y la DPP4, parámetros de remodelado óseo, ingesta dietética e IMC. El GLP1 se asoció con una reducción significativa del riesgo de osteoporosis después del ajuste por el IMC y el CTX como factores de confusión (OR = 0.724, IC 95% = 0.53-0.97),  $p = 0.031$ .

## VI. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio es la asociación entre los niveles plasmáticos del GLP1 y la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas no diabéticas. Los valores posprandiales del GLP1 son significativamente más bajos en mujeres posmenopáusicas no diabéticas con osteoporosis que sin osteoporosis, y los valores más altos se asociaron significativamente con una reducción en el riesgo de osteoporosis en los análisis de regresión logística cruda y ajustada. La presencia de osteoporosis no se asoció con los niveles del GLP2, péptido YY o la actividad de DPP4.

Se han obtenido además otros resultados que reafirman la idea de que existe una relación entre el tejido óseo y los péptidos intestinales, y esta relación se basa en los siguientes hechos: (1) el GLP1 se correlaciona de forma positiva y significativamente con el CTX dentro del grupo de marcadores de remodelado óseo en los casos, y rozando la significación en los controles y con el PINP de forma negativa solo en los controles; (2) el GLP2 se asocia de forma positiva y estadísticamente significativa con la osteocalcina el grupo de controles; (3) la actividad DPP4 se asocia significativamente de forma positiva con el PINP y negativa con el CTX en el grupo de controles. El péptido YY no se asoció estadísticamente significativa con ningún marcador de remodelado óseo (osteocalcina, PINP y CTX).

La principal limitación de nuestro estudio es que solo se ha realizado una determinación analítica de péptidos (en situación posprandial) y de marcadores del metabolismo óseo (en situación de ayuno); además de que el tamaño muestral es limitado.

Una de las apreciaciones del presente trabajo es que parece ser el primero en comparar los niveles posprandiales de péptidos (GLP1, GLP2 y péptido YY) en las mujeres posmenopáusicas no diabéticas con y sin osteoporosis.

### 1. Análisis descriptivo y osteoporosis

El análisis descriptivo en ambos grupos de comparación fue muy homogéneo, ya que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la

edad, situación laboral o antecedentes de hábitos tóxicos, como es la ingesta de alcohol y el tabaquismo. Es bien sabido que un consumo excesivo de alcohol se asocia con un mayor riesgo de fracturas (173) y que el hábito de fumar, reconocido por numerosos estudios (174)(175), aumenta el riesgo de fractura osteoporótica y por lo tanto debe evitarse.

No se hallan diferencias significativas con respecto a la ingesta de alcohol y al consumo de tabaco entre las mujeres que tenían osteoporosis frente a las que no lo padecían y podría ser debido a que un alto porcentaje de las mujeres osteoporóticas no consumían alcohol ni fumaban (74.4 % y 76.3%, respectivamente). Aun así el porcentaje de mujeres que no tomaban alcohol ni tabaco es mayor en las mujeres sin osteoporosis (86 % y 81.4%, respectivamente), lo que coincide con lo mostrado en otros estudios (176)(154).

Respecto a los antecedentes por enfermedad y teniendo en cuenta que se excluyeron pacientes con enfermedades que pueden influir en la osteoporosis (causas endocrinas o metabólicas, alteraciones gastrointestinales o nutricionales etc.)(14)(4), no se han observado diferencias significativas entre los grupos en relación a las enfermedades referidas en los antecedentes de las voluntarias del estudio tales como hipertensión arterial, dislipemia, cardiopatía, nefropatía o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Tampoco se encontraron diferencias entre casos y controles con respecto a los fármacos más habituales o que pudieran influir sobre el metabolismo óseo. Se excluyeron pacientes que tomaban fármacos que disminuyen la masa ósea, dentro de los que se incluyen los antiepilépticos, heparina, litio, inhibidores de la bomba de protones e ISGLT2 (4), fármacos basados en el efecto incretina que pudieran condicionar los resultados, como son los IDPP4 o los GLP1 RAs (103) o fármacos con beneficios para el hueso, como son el calcio, la vitamina D o los antiosteoporóticos (177).

## 2. Ingesta dietética y osteoporosis

Como se explica en la introducción, la nutrición proporciona el sustrato necesario para la actividad celular, la estructura del tejido y la función de todos los componentes del hueso. El tejido óseo no celular consta de minerales (calcio, fosfato y magnesio), colágeno y proteínas no colágenas. Por lo tanto, el crecimiento y

mantenimiento del tejido óseo requiere el suministro de nutrientes adecuados durante cada etapa de la vida (143).

En nuestro estudio también hubo homogeneidad en los dos grupos de comparación con respecto a la ingesta dietética y a la cantidad de ingesta de los principales grupos alimenticios. La ingesta de macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y de los principales grupos de alimentos (pescados, carnes, lácteos, frutas y verduras, legumbres, cereales y aceite de oliva) fue muy parecida en ambos grupos.

Como ya se ha referido, cabe destacar el papel beneficioso de los lácteos en la prevención y tratamiento de la osteoporosis, ya que contienen nutrientes que incluyen el calcio, fósforo, vitamina D y proteínas que favorecen la mineralización ósea (138)(139)(178). En nuestros resultados no se han hallado diferencias en la ingesta de lácteos (que incluye la leche, el queso y el yogur) entre las mujeres con osteoporosis frente a las que no tenían osteoporosis, con una ingesta prácticamente igual en ambos grupos. En un metaanálisis reciente (179) se concluye que una mayor ingesta de leche y productos lácteos no se asoció con un menor riesgo de osteoporosis y fractura de cadera.

### 3. Datos antropométricos y osteoporosis

Es bien sabido que el bajo peso corporal es un factor de riesgo bien establecido para una DMO baja (180) y en nuestro estudio las pacientes con osteoporosis tenían menor peso con respecto a los controles como era de esperar. Aun así el IMC medio de las pacientes con osteoporosis fue de 26.04 kg/m<sup>2</sup>, lo que corresponde con un ligero sobrepeso grado I. Este resultado está muy próximo al peso adecuado, ya que la OMS ha determinado como rango deseable para los adultos hasta los 65 años un IMC de 18.5 a 24.99 kg/m<sup>2</sup> (181).

Un metaanálisis reciente realizado en marzo de 2020 (182) concluye que los adultos con obesidad (definida con un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) tenían una DMO significativamente más alta que los adultos de peso saludable. La obesidad se asoció positivamente con la DMO y se correlacionó negativamente con la osteoporosis. Las pacientes de nuestro estudio que no padecían osteoporosis tenían un IMC medio de



30.29 kg/m<sup>2</sup>, un dato que está en la línea de estudios previos (182). Por el contrario, un bajo peso corporal está asociado con menor masa ósea, e incluso se recomienda la realización de la DEXA en pacientes con un IMC < 20 kg/m<sup>2</sup> (4).

#### 4. Parámetros del metabolismo del remodelado óseo y osteoporosis

El tejido óseo necesita para su correcto crecimiento y mantenimiento del mismo la actuación de dos hormonas fundamentales: la PTH y la vitamina D, que ejercen su acción en tres órganos: el hueso, intestino y el riñón (183).

En el presente estudio se ha observado que ambos grupos fueron similares con respecto a los parámetros analíticos que interviene en el remodelado óseo, como son la vitamina D, la PTH, el calcio, magnesio y fosfato séricos. Estos resultados aportan solidez a nuestro trabajo, ya que si existieran diferencias en algún parámetro que interviene en el remodelado óseo, los resultados de este estudio podrían ser consecuencia de una disregulación hormonal. Se sabe que la vitamina D actúa manteniendo la homeostasis del calcio. Un déficit de esta vitamina produce un aumento secundario de la hormona paratiroidea (184), y puede provocar un aumento de la resorción ósea y como consecuencia una pérdida ósea. Además, es bien sabido que el hiperparatiroidismo es una causa establecida de osteoporosis secundaria (14). En nuestro trabajo los niveles medios de vitamina D fueron de 18.63 ng/mL en los controles y de 19.3 ng/mL en los casos, y por lo tanto niveles próximos al rango de suficiencia de vitamina D que se considera con valores superiores a 20 ng/ml (184).

Tampoco se encontraron diferencias entre casos y controles en el hemograma y la bioquímica general, excepto los resultados obtenidos con la glucemia basal, que fue ligeramente más alta en los controles, aun dentro de un rango normal. Este resultado no tiene mucha trascendencia, porque la glucemia basal es un dato aislado que depende de muchos factores y lo que informa con mucha más fiabilidad del metabolismo glucídico es la HbA1c (185) que en nuestro estudio estuvo en el rango normal y fue muy similar en ambos grupos.

## 5. Péptidos intestinales y osteoporosis

Nuestros resultados han sido concluyentes con el GLP1, en el que se ha observado tanto en el test de diferencias de medias como en la regresión logística condicional una clara asociación con la osteoporosis. La asociación entre el GLP1 y el tejido óseo se ha observado previamente en estudios preclínicos.

Importantes trabajos han mostrado anteriormente la relación entre péptidos intestinales y tejido óseo, relación que ha sido más estudiada en el caso del GLP2, y en menor medida con el GLP1 y el péptido YY.

### 5.1. El GLP1

Como se indicó en la introducción, el GLP1 es segregado por las células endocrinas L distribuidas en el tracto intestinal, principalmente en el íleon a los pocos minutos de la ingesta de alimentos (186), y alcanza niveles considerables a partir de los 30 minutos de la ingesta. Se producen dos isoformas a partir del procesado transcripcional del gen del proglucagón: el GLP1<sub>7-36</sub>NH<sub>2</sub> (que es la forma mayoritariamente circulante) y el GLP1<sub>7-37</sub>. Para poder ejercer sus efectos metabólicos, el GLP1 necesita acoplarse a su receptor (89), y es inactivado rápidamente por la enzima DPP4, lo que da lugar a un GLP1<sub>9-36</sub> inactivo por su baja afinidad por el GLP1-R (187). La presencia del GLP1-R se ha demostrado en los islotes pancreáticos, pulmón, estómago, riñón, hipotálamo y corazón, pero no en el hígado, tejido adiposo o músculo esquelético (187). Nuche-Berenguer *et al.* han mostrado que el GLP1 puede actuar directamente sobre los osteoblastos cultivados (células osteoblásticas MC3T3-E1) a través de un receptor de membrana (188). Además, Pacheco-Pantoja *et al.* (189) observaron la expresión del GLP1-R en diferentes líneas celulares de osteoblastos humanos y demostraron su influencia en la secreción de osteocalcina, fosfatasa alcalina y el PINP (189).

Los mecanismos moleculares que subyacen en los efectos del GLP1 sobre el tejido óseo no están claros. El GLP1 o los GLP1-RA pueden actuar directamente sobre el hueso a través de un GLP1-R funcional expresado por las células óseas (188)(189) o indirectamente a través de un aumento en la producción de calcitonina por las células C tiroideas que inhibe la resorción ósea (190).

Se debate si las células inmaduras del linaje osteoblástico expresan el GLP1-R. El GLP1 no tiene ningún efecto sobre el hueso cuando se administra a ratones sanos (96). En roedores con diabetes y en ratas ooforectomizadas de edad avanzada (106), el GLP1 o el agonista del receptor del GLP1, la exendina-4 (191) tiene efecto anabólico en el hueso. Los ratones que carecen del GLP1-R presentan osteopenia cortical y trabecular con un incremento de la resorción osteoclástica (192). En humanos, en contraste, la administración del GLP1 no afecta ni a la osteoclastogénesis in vitro ni a los niveles séricos de CTX in vivo (90). En ratones la administración oral de osteocalcina aumenta la liberación del GLP1 intestinal (193).

Nuestro estudio comprueba que el GLP1 está relacionado con la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas no diabéticas al encontrar una menor liberación del GLP1, en respuesta a la ingesta de un preparado nutricional, en los casos que en los controles y tras observar que el GLP1 se asocia con una disminución estadísticamente significativa del riesgo de osteoporosis.

Sin embargo, nuestros hallazgos sobre la relación de los marcadores de remodelado óseo y el GLP1 fueron inesperados. Se ha hallado que el GLP1 se asoció positivamente en los casos con el CTX, un parámetro de resorción ósea, y se asoció negativamente en los controles con el PINP, un parámetro de formación ósea. Un estudio reciente de hombres con sobrepeso u obesidad informó que el GLP1 y el GIP redujeron sus niveles de CTX y que la coin fusión de ambos péptidos tuvo un efecto sinérgico en la reducción de los niveles de CTX y en la resorción ósea (108). En otra investigación las mujeres obesas que habían perdido peso después de seguir una dieta hipocalórica tenían cuatro veces menos probabilidad de perder masa ósea si se trataban con liraglutida, y mostraron un aumento del PINP pero sin cambios en el CTX en comparación con las mujeres no tratadas con este análogo del GLP1 (109).

La discrepancia entre estos resultados puede tener varias explicaciones: (1) nuestro objetivo principal fue asociar el GLP1 con la osteoporosis, no directamente con los marcadores de remodelado óseo; (2) la osteoporosis posmenopáusica es una alteración ósea en la que existe un intenso remodelado (194), con aumento de todos los marcadores de remodelado óseo con predominio final de la resorción ósea; y (3) las determinaciones de péptidos se han realizado en situación postprandial mientras que las de los parámetros de remodelado óseo se han realizado en condiciones

basales, en ayunas, lo que supone que probablemente lo que está alterado es la secreción del GLP1 en respuesta a la ingesta de alimentos. Además, nuestros resultados están al menos parcialmente de acuerdo con el estudio de Pacheco-Pantoja *et al.* en líneas celulares de osteoblastos, que informaron una reducción en la secreción del PINP después de la estimulación con el GLP1(189). Por otro lado, se ha encontrado que un polimorfismo en el GLP1-R influye en el riesgo de osteoporosis, (195) y que podría condicionar una respuesta disociada del tejido óseo al GLP1 y a sus análogos.

## 5.2. El GLP2

Como en el caso del GLP1, varios investigadores han demostrado que el GLP2 ejerce efectos beneficiosos sobre el tejido óseo (196). Sin embargo, no se ha encontrado una asociación entre el GLP2 y la osteoporosis en nuestro estudio, aunque sí se observó una asociación positiva y significativa entre el GLP2 y osteocalcina en el grupo control. El GLP1 y el GLP2 son secretados en una proporción 1:1 por las células L endocrinas intestinales, por lo que podría esperarse una diferencia similar entre los grupos en GLP2 (197). Los niveles plasmáticos en ayunas de las formas activas de estos péptidos son 5–10 pM para el GLP1 y 15–20 pM para el GLP2, y estos valores pueden ser de 2 a 5 veces más altos después de la ingesta, siendo el GLP2 más estable que el GLP1 (197). Estas diferencias iniciales pueden explicar nuestro hallazgo de disparidades en los niveles de estos péptidos. Otros estudios han descrito una divergencia similar en sus valores (83)(198).

En contraste se ha encontrado una relación significativa de la osteoporosis con el GLP1 pero no con el GLP2, que puede ser atribuible a la diferencia en sus acciones. Las principales acciones del GLP2 son a nivel intestinal (efecto trófico y estimulación de la absorción intestinal), y sus receptores están principalmente presentes en el intestino y cerebro (85)(199), aunque se sospecha su presencia, sin evidencia clara, en células del tejido óseo humano (196). Por su parte el GLP1 ejerce sus acciones a nivel pancreático, principalmente con efecto incretina, y sus receptores están presentes en un mayor número de tejidos (197) y en osteoblastos (112), con efectos directos sobre las células óseas (196).

Nuestros resultados en relación a la existencia de una asociación positiva entre el GLP2 y la osteocalcina en las mujeres sin osteoporosis es consistente con el aumento de la osteocalcina observado previamente en mujeres posmenopáusicas después de la administración subcutánea del GLP2 en ayunas (200) y también con el estudio antes mencionado sobre el aumento de osteocalcina en células del linaje osteoblástico después del tratamiento con el GLP2 (112).

### 5.3. El péptido YY

En relación al péptido YY, importantes estudios han puesto de manifiesto la relación entre este péptido y la salud ósea. Wortley *et al.* muestran como el péptido YY interviene en la regulación de la masa ósea en roedores (201)(121). Otros estudios en humanos han comprobado la importancia del péptido YY en la regulación de la masa ósea, principalmente cuando existe un desequilibrio energético, como es el caso de pacientes diagnosticados de anorexia nerviosa (97) (98)(202) o en casos de ejercicio físico intenso (203). En nuestro trabajo, no se ha observado una relación entre el péptido YY y la osteoporosis, posiblemente porque, aunque existe diferencia significativa de peso entre los dos grupos, la ingesta calórica es similar y no existe déficit energético.

### 5.4. La enzima DPP4

Con la actividad de la enzima DPP4 nuestros resultados no mostraron diferencias entre las mujeres con y sin osteoporosis, mientras que sí se asoció positivamente con el PINP y negativamente con el CTX, de forma estadísticamente significativa, pero solo en el grupo de controles. Recientemente Kim *et al.* han publicado un trabajo en el que muestran asociación de los niveles de la enzima DPP4 con el riesgo de fractura osteoporótica en mujeres postmenopáusicas no diabéticas, y que niveles elevados de la DPP4 se asocian con valores altos de marcadores de remodelado óseo; los autores indican que algunos sustratos de la DPP4 influyen en la formación y resorción ósea (204). En el estudio de Zheng *et al.* realizado en 744 mujeres posmenopáusicas sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa se muestra una mayor actividad DPP4 en pacientes con osteoporosis y una asociación positiva con la osteocalcina y con el CTX. La diferencia entre los resultados se puede

explicar en primer lugar por la diferencia del tamaño muestral y porque en el estudio de Zheng *et al.* la determinación de la actividad DPP4 se realizó en ayunas (205).

## VII. CONCLUSIONES

1. Los niveles posprandiales del GLP1 están disminuidos significativamente en las mujeres posmenopáusicas no diabéticas que padecen osteoporosis en comparación con las que no padecen osteoporosis.

2. Los niveles posprandiales más altos del GLP1 se relacionan con un menor riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas no diabéticas.

3. Los niveles del GLP2, péptido YY o la actividad de la DPP4 no se asocian con la osteoporosis.

4. El GLP1 se correlaciona de forma positiva y significativamente con el CTX en los casos y con el PINP de forma negativa en los controles.

5. El GLP2 se relaciona de forma positiva y estadísticamente significativa con la osteocalcina en el grupo de los controles.

6. La actividad DPP4 se vincula significativamente y de forma positiva con el PINP y negativa con el CTX, en el grupo de controles.

7. El péptido YY no se relaciona estadísticamente significativa con ningún marcador de remodelado óseo.

8. En ambos grupos no se hallan diferencias significativas con otros parámetros que intervienen en el remodelado óseo (calcio, fosfato, magnesio, 25-hidroxivitamina D y PTH).

### **Perspectivas futuras**

Este estudio abre una ventana de investigación entre la relación de la osteoporosis y los péptidos intestinales humanos, en el que se comprueba una asociación entre el GLP1 y la osteoporosis en pacientes posmenopáusicas no diabéticas. Los resultados sugieren que los fármacos análogos del GLP1, en la actualidad indicados en la DM2 y en la obesidad, podrían establecer una línea terapéutica nueva para el tratamiento de la osteoporosis.

Es necesario más estudios que apoyen y demuestren cómo actúan determinados péptidos intestinales sobre el hueso, además de la investigación de los efectos óseos beneficiosos o adversos de los nuevos fármacos, realizando para ello investigaciones sistemáticas en modelos preclínicos y humanos.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2013;24(1):23-57.
2. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993;94(6):646-50.
3. Baim S, Leonard MB, Bianchi M-L, Hans DB, Kalkwarf HJ, Langman CB, et al. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom*. 2008;11(1):6-21.
4. Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Diab DL, Eldeiry LS, Farooki A, et al. American association of clinical endocrinologists/American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis-2020 update. *Endrocr Pract*. 2020;26(1):1-46.
5. Kenkre J, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med*. 2018;55(3):308-27.
6. Normal skeletal development and regulation of bone formation and resorption. UpToDate [Internet]. [Consultada el 16 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/normal-skeletal-development-and-regulation-of-bone-formation-and-resorption>
7. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent bone lining cells are a major source of osteoblasts during adulthood. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2016;34(12):2930-42.
8. Manolagas S. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
9. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*. 2005;19(9):1093-104.
10. Martín-Millán M, González-Martín M, Ruíz P, Almeida M, Ros M, González-Macías J. La vía Wnt/ $\beta$ -catenina disminuye la cantidad de osteoclastos en el hueso y favorece su apoptosis. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2019;11(2):39-45.
11. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
12. Tu P, Duan P, Zhang R-S, Xu D-B, Wang Y, Wu H-P, et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2015;26(1):179-85.

13. Tresguerres FGF, Torres J, López-Quiles J, Hernández G, Vega JA, Tresguerres IF. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann Anat - Anat Anz.* 2020;227:151422.
14. Ganesan K, Jandu JS, Roane D. Osteoporosis (Secondary) [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [Consultada el 18 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470166/>
15. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology.* 2001;142(6):2205-12.
16. Clinical manifestations, diagnosis, and evaluation of osteoporosis in postmenopausal women - UpToDate [Internet]. [Consultada el 10 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www.uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-evaluation-of-osteoporosis-in-postmenopausal-women?search=osteoporosis&source=search\\_result&selectedTitle=3~150&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www.uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-evaluation-of-osteoporosis-in-postmenopausal-women?search=osteoporosis&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=2)
17. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Jonsson B, de Laet C, Dawson A. The burden of osteoporotic fractures: a method for setting intervention thresholds. *Osteoporos Int.* 2001;12(5):417-27.
18. Nuti R, Brandi ML, Checchia G, Di Munno O, Dominguez L, Falaschi P, et al. Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. *Intern Emerg Med.* 2019;14(1):85-102.
19. Introduction | Osteoporosis: assessing the risk of fragility fracture | Guidance | NICE [Internet]. [Consultada el 6 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg146/chapter/Introduction>
20. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019;30(1):3-44.
21. Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, Iuliano-Burns S, Mirams M, Price RI, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet.* 2010;375(9727):1729-36.
22. Rizzoli R. Postmenopausal osteoporosis: Assessment and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(5):739-57.
23. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res* 2014;29(11):2520-6.
24. Screening for osteoporosis - UpToDate [Internet]. [Consultada el 9 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/screening-for->

osteoporosis?search=osteoporosis&source=search\_result&selectedTitle=3~150&usage\_type=default&display\_rank=3

25. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17(12):1726-33.
26. Kanis JA, Odén A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, Cooper C. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int.* 2012;23(9):2239-56.
27. Ballane G, Cauley JA, Luckey MM, El-Hajj Fuleihan G. Worldwide prevalence and incidence of osteoporotic vertebral fractures. *Osteoporos Int* 2017;28(5):1531-42.
28. Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, O’Fallon WM, Melton LJ. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol.* 1993;137(9):1001-5.
29. Veronese N, Maggi S. Epidemiology and social costs of hip fracture. *Injury.* 2018;49(8):1458-60.
30. Kanis JA, Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *Osteoporos Int.* 1994;4(6):368-81.
31. Sheu A, Diamond T. Bone mineral density: testing for osteoporosis. *Aust Prescr.* 2016;39(2):35-9.
32. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312(7041):1254-9.
33. Black DM, Rosen CJ. Postmenopausal osteoporosis. Solomon CG, editor. *N Engl J Med.* 2016;374(3):254-62.
34. Seeman E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(1):1-8.
35. Szulc P. Bone turnover: Biology and assessment tools. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(5):725-38.
36. Wu Q-Y, Wang J, Tong X, Chen J, Wang B, Miao Z-N, et al. Emerging role of circadian rhythm in bone remodeling. *J Mol Med.* 2019;97(1):19-24.
37. Frost HM. Bone remodeling dynamics. *Arthritis Rheum.* 1964;7(5):545-545.
38. Agerbæk MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde Le, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 1991;12(2):101-12.
39. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff’s law: the remodeling problem. *Anat Rec.* 1990;226(4):414-22.

40. Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open* [Internet]. 2015 [Consultada el 7 de enero de 2020];1(Suppl 1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632148/>
41. Schaffler MB, Cheung W-Y, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):5-24.
42. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-96.
43. Yedavally-Yellayi S, Ho AM, Patalinghug EM. Update on osteoporosis. *Prim Care Clin Off Pract.* 2019;46(1):175-90.
44. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1.
45. Russow G, Jahn D, Appelt J, Märdian S, Tsitsilonis S, Keller J. Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration. *Int J Mol Sci* [Internet]. 26 de diciembre de 2018 [Consultada el 17 de agosto de 2020];20(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337474/>
46. McGrath EE. OPG/RANKL/RANK Pathway as a Therapeutic Target in Cancer. [Consultada el 13 de julio de 2020]; Disponible en: <https://core.ac.uk/reader/82520880>
47. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL Required for osteoclast formation in remodeling bone. *PloS One.* 2015;10(9):e0138189.
48. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* marzo de 2012;27(3):499-505.
49. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-4.
50. Kim J, Kim J, Kim J, Ku S, Jee B, Suh C, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause.* 2007;14(5):913-8.
51. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92.
52. La vía Wnt/ $\beta$ -catenina disminuye la cantidad de osteoclastos en el hueso y favorece su apoptosis [Internet]. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral · Publicación Oficial SEIOMM.* 2019 [Consultada el 18 de julio de 2020]. Disponible en: <https://revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com/2019/11/05/%ef%bb%bfla->

via-wnt%ce%b2-catenina-disminuye-la-cantidad-osteoclastos-hueso-favorece-apoptosis/

53. Gómez-Orte E, Sáenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet TIG*. 2013;29(9):545-53.
54. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2014;29(3):685-92.
55. Van Driel M, van Leeuwen JPTM. Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *BoneKEy Rep*. 2014;3:493.
56. Bassett JHD, Williams GR. Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocr Rev*. 2016;37(2):135-87.
57. Iglesias L, Yeh JK, Castro-Magana M, Aloia JF. Effects of growth hormone on bone modeling and remodeling in hypophysectomized young female rats: a bone histomorphometric study. *J Bone Miner Metab*. 2011;29(2):159-67.
58. Frenkel B, White W, Tuckermann J. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:179-215.
59. Henneicke H, Gasparini SJ, Brennan-Speranza TC, Zhou H, Seibel MJ. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(4):197-211.
60. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2005;3(3):98-102.
61. Drake MT, Clarke BL, Lewiecki EM. The pathophysiology and treatment of osteoporosis. *Clin Ther*. 2015;37(8):1837-50.
62. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M-C, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1996;11(3):337-49.
63. Bruderer M, Richards R, Alini M, Stoddart M. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*. 2014;28:269-86.
64. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(5):294-301.
65. Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int*. 1993;53 Suppl 1:S94-98.
66. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1996;11(8):1043-51.
67. Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Bone turnover markers in the diagnosis and monitoring of metabolic bone disease. *Clin Chem*. 2017;63(2):464-74.

68. Jain S, Camacho P. Use of bone turnover markers in the management of osteoporosis: *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;25(6):366-72.
69. Wheeler G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med.* 2013;11:201.
70. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):97-122.
71. Smith C, Voisin S, Al Saedi A, Phu S, Brennan-Speranza T, Parker L, et al. Osteocalcin and its forms across the lifespan in adult men. *Bone.* 2020;130:115085.
72. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet.* 2020;16(5):e1008586.
73. Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone.* 1985;6(5):339-41.
74. Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone.* 2002;30(6):886-90.
75. Wichers M, Schmidt E, Bidlingmaier F, Klingmüller D. Diurnal rhythm of crossLaps in human serum. *Clin Chem.* 1999;45(10):1858-60.
76. Delanaye P, Souberbielle J-C, Lafage-Proust M-H, Jean G, Cavalier E. Can we use circulating biomarkers to monitor bone turnover in CKD haemodialysis patients? Hypotheses and facts. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(5):997-1004.
77. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International osteoporosis foundation and international federation of clinical chemistry and laboratory medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(8):1271-4.
78. Redmond J, Fulford AJ, Jarjou L, Zhou B, Prentice A, Schoenmakers I. Diurnal rhythms of bone turnover markers in three ethnic groups. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):3222-30.
79. Yavropoulou MP, Yovos JG. Incretins and bone : Evolving concepts in nutrient-dependent regulation of bone turnover. *Hormones.* 2013;12(2):214-23.
80. Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, et al. Disassociation of bone resorption and formation by GLP-2: a 14-day study in healthy postmenopausal women. *Bone.* 2007;40(3):723-9.
81. Walsh JS, Henriksen DB. Feeding and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(1):11-9.
82. Deal C. Future therapeutic targets in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21(4):380-5.

83. Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ, Schlemmer A, Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone*. 2002;31(1):57-61.
84. Heshmati HM, Riggs BL, Burritt MF, Mcalister CA, Wollan PC, Khosla S. Effects of the circadian variation in serum cortisol on markers of bone turnover and calcium homeostasis in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):751-6.
85. Kotlarczyk MP, Lassila HC, O'Neil CK, D'Amico F, Enderby LT, Witt-Enderby PA, et al. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): a randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. *J Pineal Res*. 2012;52(4):414-26.
86. Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, Gamwell Henriksen E, Qvist P, Alexandersen P, et al. Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone*. 2000;26(5):505-11.
87. Bjarnason NH, Henriksen EEG, Alexandersen P, Christgau S, Henriksen DB, Christiansen C. Mechanism of circadian variation in bone resorption. *Bone*. 2002;30(1):307-13.
88. Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: Physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(6):525-36.
89. Mabileau G, Pereira M, Chenu C. Novel skeletal effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists. *J Endocrinol*. 2018;236(1):29-42.
90. Henriksen DB, Alexandersen P, Bjarnason NH, Vilsbøll T, Hartmann B, Henriksen EE, et al. Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2003;18(12):2180-9.
91. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(Suppl.1):5-21.
92. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet Lond Engl*. 2006;368(9548):1696-705.
93. Luo G, Liu H, Lu H. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: potential to reduce fracture risk in diabetic patients? *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81(1):78-88.
94. Wong IP, Baldock PA, Herzog H. Gastrointestinal peptides and bone health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(1):44-50.
95. Yavropoulou M, Yovos J. Incretins and bone: Evolving concepts in nutrient-dependent regulation of bone turnover. *Hormones*. 2013;12(2):214-23.
96. Lafage Proust M-H. How the gut affects bone metabolism. *Joint Bone Spine*. 2017;84(5):515-9.

97. Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, et al. Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):1027-33.
98. Utz AL, Lawson EA, Misra M, Mickley D, Gleysteen S, Herzog DB, et al. Peptide YY (PYY) Levels and bone mineral density in women with anorexia nervosa. *Bone.* 2008;43(1):135-9.
99. Chia CW, Egan JM. Incretins in obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2020;1461(1):104-26.
100. Yabe D, Kuwata H, Seino Y. The journey to understanding incretin systems: theory, practice and more theory. *J Diabetes Investig.* 2019;10(5):1171-3.
101. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006;368(9548):1696-705.
102. Reyes Sanamé FA, Pérez Álvarez ML, Alfonso Figueredo E, Céspedes Cuenca Y, Ardevol Proenza E. Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Cuba Med.* 2015;54(2):151-66.
103. Jackuliak J, Kužma M, Payer J. Effect of antidiabetic treatment on bone. *Physiol Res.* 2019;107-20.
104. Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiol Res.* 2015;64(4):439-45.
105. Mabileau G, Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, Chappard D. Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *J Endocrinol.* 2013;219(1):59-68.
106. Ma X, Meng J, Jia M, Bi L, Zhou Y, Wang Y, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2013;28(7):1641-52.
107. Meng J, Ma X, Wang N, Jia M, Bi L, Wang Y, et al. Activation of GLP-1 receptor promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through  $\beta$ -Catenin. *Stem Cell Rep.* 2016;6(4):579-91.
108. Bergmann NC, Lund A, Gasbjerg LS, Jørgensen NR, Jessen L, Hartmann B, et al. Separate and combined effects of GIP and GLP-1 infusions on bone metabolism in overweight men without diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(7):2953-60.
109. Iepsen EW, Lundgren JR, Hartmann B, Pedersen O, Hansen T, Jørgensen NR, et al. GLP-1 receptor agonist treatment increases bone formation and prevents bone loss in weight-reduced obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):2909-17.



110. Su B, Sheng H, Zhang M, Bu L, Yang P, Li L, et al. Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*. 2015;48(1):107-15.
111. Cheng L, Hu Y, Li Y-Y, Cao X, Bai N, Lu T-T, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of bone fracture in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35(7):3168.
112. Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJ, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*. 2011;11:12.
113. Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, et al. Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. *Bone*. 2009;45(5):833-42.
114. Karsdal M.A., Holst J.J., Henriksen D. GLP-2 reduces bone resorption in vitro via the osteoclast GLP-2 receptor. *J Bone Miner Res*. 2004; 19:416.
115. Zhong Q, Itokawa T, Sridhar S, Ding K-H, Xie D, Kang B, et al. Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *Endocrinol Metab*. 2007;292:6.
116. Mabilleau G. Incretins and bone: friend or foe? *Curr Opin Pharmacol*. 2015;22:72-8.
117. Xie D, Cheng H, Hamrick M, Zhong Q, Ding K-H, Correa D, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover. *Bone*. 2005;37(6):759-69.
118. Gaudin-Audrain C, Irwin N, Mansur S, Flatt PR, Thorens B, Baslé M, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor deficiency leads to modifications of trabecular bone volume and quality in mice. *Bone*. 2013;53(1):221-30.
119. Mabilleau G, Mieczkowska A, Irwin N, Simon Y, Audran M, Flatt PR, et al. Beneficial effects of a N-terminally modified GIP agonist on tissue-level bone material properties. *Bone*. 2014;63:61-8.
120. Nissen A, Christensen M, Knop FK, Vilsbøll T, Holst JJ, Hartmann B. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide inhibits bone resorption in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):2325-2329.
121. Wong IPL, Driessler F, Khor EC, Shi Y-C, Hörner B, Nguyen AD, et al. Peptide YY regulates bone remodeling in mice: a link between gut and skeletal biology. *PloS One*. 2012;7(7):e40038.
122. Wortley KE, Garcia K, Okamoto H, Thabet K, Anderson KD, Shen V, et al. Peptide YY regulates bone turnover in rodents. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1534-43.

123. Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. UpToDate [Internet]. [Consultada el 23 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www-uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/dipeptidyl-peptidase-4-dpp-4-inhibitors-for-the-treatment-of-type-2-diabetes-mellitus>
124. Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2474-6.
125. Josse RG, Majumdar SR, Zheng Y, Adler A, Bethel MA, Buse JB, et al. Sitagliptin and risk of fractures in type 2 diabetes: Results from the TECOS trial. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(1):78-86.
126. Chen L-R, Hou P-H, Chen K-H. Nutritional support and physical modalities for people with osteoporosis: current opinion. *Nutrients*. 2019;11(12):2848.
127. Brondani JE, Comim FV, Flores LM, Martini LA, Premaor MO. Fruit and vegetable intake and bones: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2019;14(5):e0217223.
128. Bonjour J-P, Kraenzlin M, Levasseur R, Warren M, Whiting S. Dairy in adulthood: from foods to nutrient interactions on bone and skeletal muscle health. *J Am Coll Nutr*. 2013;32(4):251-63.
129. Bonjour J-P. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr*. 2005;24(6 Suppl):526S-36S.
130. Darling AL, Millward DJ, Torgerson DJ, Hewitt CE, Lanham-New SA. Dietary protein and bone health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(6):1674-92.
131. Rizzoli R, Ammann P, Chevalley T, Bonjour J-P. Protein intake and bone disorders in the elderly. *Joint Bone Spine*. 2001;68(5):383-92.
132. Schurch M-A, Rizzoli R, Slosman D, Vadas L, Vergnaud P, Bonjour J-P. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. *Ann Intern Med*. 1998;128(10):801-9.
133. Corwin RL, Hartman TJ, Maczuga SA, Graubard BI. Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III. *J Nutr*. 2006;136(1):159-65.
134. Martínez-Ramírez MJ, Palma S, Martínez-González MA, Delgado-Martínez AD, de la Fuente C, Delgado-Rodríguez M. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(9):1114-20.
135. Salari Sharif P, Asalforoush M, Ameri F, Larijani B, Abdollahi M. The effect of n-3 fatty acids on bone biomarkers in Iranian postmenopausal osteoporotic women: a randomized clinical trial. *Age*. 2010;32(2):179-86.

136. McNaughton SA, Wattanapenpaiboon N, Wark JD, Nowson CA. An energy-dense, nutrient-poor dietary pattern is inversely associated with bone health in women. *J Nutr.* 2011;141(8):1516-23.
137. De França NAG, Camargo MBR, Lazaretti-Castro M, Peters BSE, Martini LA. Dietary patterns and bone mineral density in brazilian postmenopausal women with osteoporosis: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr.* 2016;70(1):85-90.
138. Bonjour J-P. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr.* 2011;30(5 Suppl 1):438S-48S.
139. Bonjour J-P. Protein intake and bone health. *Int J Vitam Nutr Res.* 2011;81(2-3):134-42.
140. Martín Jiménez JA. Factores nutricionales en la prevención de la osteoporosis. *Nutr Hosp.* 2015;(1):49-55.
141. Hamidi M, Tarasuk V, Corey P, Cheung AM. Association between the healthy eating index and bone turnover markers in US postmenopausal women aged  $\geq 45$  y. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):199-208.
142. Luo S yang, Li Y, Luo H, Yin X hai, Lin D ren, Zhao K, et al. Increased intake of vegetables, but not fruits, may be associated with reduced risk of hip fracture: A meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6(1):19783.
143. Hurley DL, Binkley N, Camacho PM, Diab DL, Kennel KA, Malabanan A, et al. The use of vitamins and minerals in skeletal health: american association of clinical endocrinologists and the american college of endocrinology position statement. *Endocr Pract.* 2018;24(10):915-24.
144. Ortega RM, González LG, Navia B, Perea JM, et al. Ingesta de calcio y vitamina D en una muestra representativa de mujeres. *Nutr Hosp.* 2013;(2):303-13.
145. Dusso AS. El sistema hormonal de la vitamina D: lo que sabemos y lo que nos queda por saber. *Nefrología.* 2011;2(5):37-43.
146. Manual de Endocrinología y Nutrición» Capítulo 143. Enfermedades relacionadas con la homeostasis del fósforo y la hormona D [Internet]. [Consultada el 13 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://manual.seen.es/article?id=55114db3-db18-4ea5-ad56-44feac18103c&keywords=vitamina%20d>
147. Iwamoto J. Vitamin K2 therapy for postmenopausal osteoporosis. *Nutrients.* 2014;6(5):1971-80.
148. Díaz Curiel M. Acción de la vitamina K sobre la salud ósea. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2015;7(1):33-8.
149. Hamidi MS, Cheung AM. Vitamin K and musculoskeletal health in postmenopausal women. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(8):1647-57.
150. Kruger MC, Booth CL, Coad J, Schollum LM, Kuhn-Sherlock B, Shearer MJ. Effect of calcium fortified milk supplementation with or without vitamin K on

- biochemical markers of bone turnover in premenopausal women. *Nutrition*. 2006;22(11-12):1120-8.
151. Kanellakis S, Moschonis G, Tenta R, Schaafsma A, van den Heuvel EGHM, Papaioannou N, et al. Changes in parameters of bone metabolism in postmenopausal women following a 12-month intervention period using dairy products enriched with calcium, vitamin D, and phylloquinone (vitamin K1) or menaquinone-7 (vitamin K2): the postmenopausal health study II. *Calcif Tissue Int*. 2012;90(4):251-62.
152. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Mol Basel Switz*. 2019;24(6).
153. Jackson HA, Sheehan AH. Effect of vitamin A on fracture risk. *Ann Pharmacother*. 2005;39(12):2086-90.
154. Mikosch P. Alcohol and bone. *Wien Med Wochenschr*. 2014;164(1):15-24.
155. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, et al. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2012;55(12):3262-72.
156. Davenport RJ, Wright S. Treating obesity: is it all in the gut? *Drug Discov Today*. 2014;19(7):845-58.
157. Driessen JHM, van Onzenoort HAW, Starup-Linde J, Henry R, Burden AM, Neef C, et al. Use of glucagon-like-peptide 1 receptor agonists and risk of fracture as compared to use of other anti-hyperglycemic drugs. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(5):506-15.
158. Meier C, Schwartz A V., Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone Elsevier*. 2016;82:93-100.
159. Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2474-6.
160. Hussain H, Abbas G, Green IR, Ali I. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors as a potential target for diabetes: patent review (2015-2018). *Expert Opin Ther Pat*. 2019;29(7):535-53.
161. Gómez Huelgas R, Díez-Espino J, Formiga F, Lafita Tejedor J, Rodríguez Mañas L, González-Sarmiento E, et al. Tratamiento de la diabetes tipo 2 en el paciente anciano. *Med Clin (Barc)*. 2013;140(3):134.e1-134.e12.
162. Nauck MA, Meier JJ. Management of endocrine disease: are all GLP-1 agonists equal in the treatment of type 2 diabetes? *Eur J Endocrinol*. 2019;181(6):R211-34.
163. Lin C-H, Shao L, Zhang Y-M, Tu Y-J, Zhang Y, Tomlinson B, et al. An evaluation of liraglutide including its efficacy and safety for the treatment of obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2020;21(3):275-85.

164. Rocha MHMD, Lee ADW, Marin MLDM, Faintuch S, Mishaly A, Faintuch J. Treating short bowel syndrome with pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(6):709-20.
165. Jeppesen PB, Pertkiewicz M, Forbes A, Pironi L, Gabe SM, Joly F, et al. Quality of life in patients with short bowel syndrome treated with the new glucagon-like peptide-2 analogue teduglutide – analyses from a randomised, placebo-controlled study. *Clin Nutr.* 2013;32(5):713-21.
166. Ceccarelli E, Guarino EG, Merlotti D, Patti A, Gennari L, Nuti R, et al. Beyond glycemic control in diabetes mellitus: effects of incretin-based therapies on bone metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:73.
167. Wojcik MH, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Klibanski A, Miller KK. Reduced amylin levels are associated with low bone mineral density in women with anorexia nervosa. *Bone.* 2010;46(3):796-800.
168. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(Supplement 1):S14-31.
169. Salvador B, Rodríguez LM, Güell R, Álvarez V, Sanz H, et al. Estimación del filtrado glomerular según MDRD-4 IDMS y CKD-EPI en individuos de edad igual o superior a 60 años en atención primaria. *Nefrología.* 2013;33(4):552-63.
170. Hattori A, Kawamura I, Yamada Y, Kanamori H, Aoyama T, Ushikoshi H, et al. Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2013;3(9):e003201.
171. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993;22(3):512-9.
172. Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Irala JD, Marti A, Martínez JA. Mediterranean diet and stroke: objectives and design of the SUN project. *Nutr Neurosci.* 2002;5(1):65-73.
173. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int.* 2005;16(7):737-42.
174. Giampietro PF, McCarty C, Mukesh B, McKiernan F, Wilson D, Shuldiner A, et al. The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: a pilot study utilizing the Marshfield Clinic Personalized Medicine Cohort. *Osteoporos Int.* 2010;21(3):467-77.
175. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(2):155-62.
176. Villarín Castro A, Hernández Sanz A. Valoración del riesgo de fractura osteoporótica. *Rev Clínica Med Fam.* 2015;8(1):48-58.

177. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet*. 2019;393(10169):364-76.
178. Rojo-Martínez G. La importancia de los lácteos en la dieta: más allá del hueso. *Nutr Hosp*. 2019;36(3):497-498.
179. Malmir H, Larijani B, Esmailzadeh A. Consumption of milk and dairy products and risk of osteoporosis and hip fracture: a systematic review and Meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(10):1722-37.
180. Tomlinson D, Morgan SL. Eating disorders and bone. *J Clin Densitom*. 2013;16(4):432-8.
181. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2007;128(5):184-96.
182. Qiao D, Li Y, Liu X, Zhang X, Qian X, Zhang H, et al. Association of obesity with bone mineral density and osteoporosis in adults: a systematic review and meta-analysis. *Public Health*. 2020;180:22-8.
183. Navarro-Moreno MA, Alía-Ramos P. Metabolismo óseo. Vitamina D Y PTH. *Endocrinol Nutr*. 2006;53(3):199-208.
184. Vitamin D deficiency in adults: Definition, clinical manifestations, and treatment. UpToDate [Internet]. [Consultada el 14 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www-uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/vitamin-d-deficiency-in-adults-definition-clinical-manifestations-and-treatment?search=VITAMIN%20D&source=search\\_result&selectedTitle=2~145&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/vitamin-d-deficiency-in-adults-definition-clinical-manifestations-and-treatment?search=VITAMIN%20D&source=search_result&selectedTitle=2~145&usage_type=default&display_rank=1)
185. Estimation of blood glucose control in diabetes mellitus. UpToDate [Internet]. [Consultada el 14 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www-uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/estimation-of-blood-glucose-control-in-diabetes-mellitus?search=hemoglobina%20glicosilada&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.m-hulp.a17.csinet.es/contents/estimation-of-blood-glucose-control-in-diabetes-mellitus?search=hemoglobina%20glicosilada&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
186. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(2):G299-305.
187. Cantini G, Mannucci E, Luconi M, Baggio LL, al. et, Sandoval DA, et al. Perspectives in GLP-1 research: new targets, new receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(6):427-38.
188. Nuche-Berenguer B, Portal-Núñez S, Moreno P, González N, Acitores A, López-Herradón A, et al. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):585-92.

189. Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJM, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol.* 2011;11(12):1-14.
190. Zhao C, Liang J, Yang Y, Yu M, Qu X. The Impact of Glucagon-Like Peptide-1 on Bone Metabolism and its possible mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:98.
191. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Nuñez S, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Pept.* 2010;159(1-3):61-6.
192. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology.* 2008;149(2):574-9.
193. Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S, Takahashi I, et al. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone.* 2014;69:68-79.
194. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY Study. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8):1526-36.
195. Fu S, Xu W, Zhang Y, Wu Z, Xia H, He G, et al. Polymorphism of glucagon-like peptide-1 receptor gene (rs1042044) is associated with bone mineral density in Chinese Han postmenopausal women. *Afr J Biotechnol.* 2015;14(8):714-718-718.
196. Schiellerup SP, Skov-Jepesen K, Windeløv JA, Svane MS, Holst JJ, Hartmann B, et al. Gut hormones and their effect on bone metabolism. Potential drug therapies in future osteoporosis treatment. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:75.
197. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(4):531-54.
198. Trautvetter U, Jahreis G. Effect of supplementary calcium phosphate on plasma gastrointestinal hormones in a double-blind, placebo-controlled, cross-over human study. *Br J Nutr.* 2014;111(2):287-93.
199. Burrin DG, Petersen Y, Stoll B, Sangild P. Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor. *J Nutr.* 2001;131(3):709-12.
200. Henriksen DB, Alexandersen P, Byrjalsen I, Hartmann B, Bone HG, Christiansen C, et al. Reduction of nocturnal rise in bone resorption by subcutaneous GLP-2. *Bone.* 2004;34(1):140-7.
201. Wong IPL, Driessler F, Khor EC, Shi Y-C, Hörmer B, Nguyen AD, et al. Peptide YY regulates bone remodeling in mice: a link between gut and skeletal biology. *PLoS ONE.* 2012;7(7).

202. Misra M, Prabhakaran R, Miller KK, Goldstein MA, Mickley D, Clauss L, et al. Prognostic indicators of changes in bone density measures in adolescent girls with anorexia nervosa-II. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1292-7.
203. Scheid JL, Toombs RJ, Ducher G, Gibbs JC, Williams NI, De Souza MJ. Estrogen and peptide YY are associated with bone mineral density in premenopausal exercising women. *Bone.* 2011;49(2):194-201.
204. Kim H, Baek KH, Lee S-YYH, Ahn SH, Lee S-YYH, Koh J-MM, et al. Association of circulating dipeptidyl-peptidase 4 levels with osteoporotic fracture in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2017;28(3):1099-108.
205. Zheng T, Yang L, Liu Y, Liu H, Yu J, Zhang X, et al. Plasma DPP4 activities are associated with osteoporosis in postmenopausal women with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(10):3862-70.



## IX. TABLAS

**Tabla 1. Análisis descriptivo**

Variables	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	Valor de <i>p</i>
<b>Edad (años), media (EEM)</b>	58.8 (0.6)	58.7 (0.6)	0.98
	Frecuencias n (%)		
<b>Situación laboral, n (%)</b>			0.168
En activo	21 (48.8)	29 (67.4)	
Jubilado o desempleado	5 (11.6)	5 (11.6)	
Ama de casa	17 (39.5)	9 (20.9)	
<b>Tabaco n (%)</b>			0.702
No	35 (81.4)	33 (76.3)	
1-4 cigarrillos día	0 (0.0)	2 (4.7)	
5-10 cigarrillos día	3 (7.0)	3 (7.0)	
>10 cigarrillos día	4 (9.3)	4 (9.3)	
Sin respuesta	1 (2.3)	1 (2.3)	
<b>Alcohol</b>			0.152
No	37 (86.0)	32 (74.4)	
Ocasional	2 (4.7)	8 (18.6)	
<10 gramos/ día	3 (7.0)	3 (7.0)	

**EEM:** error estándar de la media

**Tabla 2. Antecedentes personales y tratamientos farmacológicos (análisis de frecuencias)**

Variables		Frecuencias n (%)		Valor de p
		Controles (n= 43)	Casos (n = 43)	
<b>Antecedentes personales</b>				
Hipertensión	No	34 (79.07)	38 (88.37)	0.191
	Sí	9 (20.93)	5 (11.63)	
Dislipemia	No	35 (83.33)	38 (88.37)	0.362
	Sí	7 (16.67)	5 (11.63)	
Cardiopatía	No	38 (90.48)	41 (95.35)	0.327
	Sí	4 (9.52)	2 (4.65)	
Nefropatía	No	42 (100)	43 (100)	
	Sí	0 (0)	0 (0)	
EPOC	No	42 (100)	43 (100)	
	Sí	0 (0)	0 (0)	
<b>Tratamientos farmacológicos</b>				
Diurético	No	40 (95.24)	42 (97.67)	0.491
	Sí	2 (4.76)	1 (2.33)	
Antihipertensivo	No	30 (71.43)	36 (83.72)	0.136
	Sí	12 (28.57)	7 (16.28)	
Analgésicos	No	39 (92.86)	38 (88.37)	0.370
	Sí	3 (7.14)	5 (11.63)	
Anticoagulantes	No	42 (100)	42 (97.67)	0.506
	Sí	0 (0)	1 (2.33)	
Antiagregantes	No	40 (95.24)	43 (100)	0.241
	Sí	2 (4.76)	0 (0)	
Antidemencia	No	42 (100)	43 (100)	
	Sí	0 (0)	0 (0)	
Ansiolíticos	No	38 (90.48)	39 (90.70)	0.630
	Sí	4 (9.52)	4 (9.3)	
Estatinas	No	31 (73.81)	37 (86.05)	0.127
	Sí	11 (26.19)	6 (13.95)	
Antidepresivos	No	40 (95.24)	40 (93.02)	0.511
	Sí	2 (4.76)	3 (6.98)	
IBP	No	39 (92.86)	39 (90.70)	0.513
	Sí	3 (7.14)	4 (9.30)	
Vitamina B12	No	42 (100)	43 (100)	
	Sí	0 (0)	0 (0)	
Vitamina D	No	42 (100)	43 (100)	
	Sí	0 (0)	0 (0)	
Calcio	No	41 (97.62)	42 (97.67)	0.747
	Sí	1 (2.38)	1 (2.33)	

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**IBP:** inhibidores de la bomba de protones

**Tabla 3. Comparación de medias entre casos y controles: principales grupos de alimentos**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
Verdura total	586.42 (60.07)	602.89 (72.62)	0.86
Fruta total	643.94 (86.75)	687.11 (101.73)	0.74
Legumbres	33.58 (4.48)	30.48 (5.65)	0.66
Cereales	180.15 (17.76)	148.94 (14.05)	0.17
Cereales integrales	48.11 (8.48)	27.37 (6.94)	0.06
Lácteos	456.87 (39.44)	455.34 (38.59)	0.97
Yogur	65.91 (12.75)	98.86 (18.92)	0.15
Cárnicos	163.67 (18.75)	184.73 (20.13)	0.44
Embutidos	6.33 (1.54)	6.91 (1.78)	0.81
Aceite de oliva	26.27 (2.62)	28.27 (3.59)	0.65
Pescado	134.97 (15.86)	167.97 (18.15)	0.17

**EEM:** error estándar de la media

**Tabla 4. Comparación de medias entre casos y controles: macro y micronutrientes**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
Carbohidratos	288.24 (13.14)	270.69 (7.74)	0.25
Fibra total	41.02 (2.65)	36.96 (2.33)	0.25
Proteínas	120.95 (4.99)	125.97 (5.55)	0.51
Grasa total	111.95 (4.98)	113.75 (4.11)	0.78
Monoinsaturado	48.38 (2.55)	50.12 (2.63)	0.63
Poliinsaturados	18.90 (0.83)	19.37 (1.17)	0.74
Saturados	32.57 (3.32)	31.71 (1.55)	0.81
AG. Trans	0.77 (0.12)	0.87 (0.09)	0.52
AGP N6	14.08 (0.81)	14.23 (1.09)	0.91
AGP N3 no marinos	1.92 (0.15)	1.97 (0.18)	0.83
AGP N3 marinos	1.11 (0.11)	1.39 (0.11)	0.08
Colesterol	473.25 (35.21)	562.25 (36.12)	0.08
Carga glicémica	139.56 (8.05)	129.18 (4.56)	0.26
Vitamina A	2401.83 (237.95)	2458.91 (223.85)	0.86
Vitamina D	7.29 (0.71)	8.85 (0.89)	0.17
Vitamina E	12.43 (0.58)	13.21 (0.76)	0.42

**Tabla 4 (continuación). Comparación de medias entre casos y controles: macro y micronutrientes**

Vitamina C	325.71 (23.56)	318.17 (28.67)	0.83
Hierro	22.08 (0.73)	22.25 (1.19)	0.91
Sodio	3464.52 (175.82)	3249.35 (88.07)	0.28
Magnesio	560.71 (17.82)	559.04 (24.21)	0.95
Calcio	1487.38 (109.79)	1426.66 (62.07)	0.63
Fósforo	2302.57 (97.66)	2290.53 (82.06)	0.92
Potasio	4.4 (0.04)	4.37 (0.05)	0.76
Yodo	393.43 (29.22)	400.57 (29.59)	0.86
Selenio	124.78 (5.67)	127.18 (5.17)	0.76
Zinc	15.17 (0.47)	14.57 (0.38)	0.33

**EEM:** error estándar de la media

**AG trans:** ácidos grasos transaturados

**AGP N6:** ácidos grasos omega 6

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 no marinos

**AGP N3 marinos:** ácidos grasos omega 3 marinos

**Tabla 5. Comparación de medias entre casos y controles: antropometría y densitometría**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
<b>Antropometría</b>			
Peso (kg), media (EEM)	75.06 (2.13)	63.39 (1.84)	< 0.001
Altura (cm), media (EEM)	157.6 (0.84)	156.19 (1.21)	0.336
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), media (EEM)	30.29 (0.90)	26.04 (0.74)	< 0.001
<b>Densitometría</b>			
T-score columna lumbar	0.185 (0.10)	- 2.823 (0.10)	< 0.001
Z-score columna lumbar	1.274 (0.11)	- 1.344 (0.14)	< 0.001
T-score fémur	0.302 (0.12)	- 1.92 (0.13)	< 0.001
Z-score fémur	0.89 (0.11)	- 1.11 (0.13)	< 0.001

**EEM:** error estándar de la media

**IMC:** índice de masa corporal

**Tabla 6. Comparación de medias entre casos y controles: péptidos intestinales**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
GLP1 (pg/ml)	126.79 (2.68)	116.75 (2.68)	<0.001
GLP2 (pg/ml)	308.91 (13.27)	310.49 (14.3)	0.933
PYY (pg/ml)	0.503 (0.015)	0.459 (0.024)	0.121
DDP4 (pmol/min/mL)	7643.02 (223.2)	7711 (207.9)	0.822

**EEM:** error estándar de la media

**GLP1:** *glucagon-like peptide 1*

**GLP2:** *glucagon-like peptide 2*

**PYY:** péptido tirosina-tirosina

**DPP4:** actividad enzima dipeptidil peptidasa 4

**Tabla 7. Comparación de medias entre casos y controles: marcadores de remodelación ósea**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
Ca sérico corregido (mg/dL)	9.26 (0.05)	9.31 (0.03)	0.373
Fósforo sérico (mg/dL)	3.24 (0.05)	3.36 (0.08)	0.234
Magnesio sérico (mg/dL)	2.009 (0.03)	2.01 (0.03)	0.92
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	18.63 (1.05)	19.3 (30)	0.652
PTH (pg/mL)	58.51 (7.87)	47.88 (2.75)	0.206
Osteocalcina (ng/mL)	19.36 (1.07)	23.23 (1.11)	0.014
PINP (ng/mL)	39.04 (2.16)	51.24 (3.05)	0.001
CTX (ng/mL)	0.322 (0.02)	0.481 (0.03)	< 0.001

**EEM:** error estándar de la media

**PTH:** parathormona

**PINP:** propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1

**CTX:** telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1



**Tabla 8. Comparación de medias entre casos y controles: hemograma y bioquímica general**

Variables	Media (EEM)		Valor de <i>p</i>
	Controles ( <i>n</i> = 43)	Casos ( <i>n</i> = 43)	
Hemoglobina	13.35 (0.31)	13.87 (0.16)	0.14
Plaquetas	238.27 (7.46)	242.11 (8.94)	0.74
Linfocitos totales	8.30 (6.44)	13.68 (8.15)	0.605
Glucosa	94.302 (1.51)	89.55 (1.51)	0.028
Hemoglobina glicosilada	5.53 (0.04)	5.51 (0.04)	0.85
Urea	36.04 (1.51)	34.06 (1.11)	0.29
Creatinina	0.92 (0.02)	0.91 (0.22)	0.64
Colesterol total	226.91 (7.33)	242.21 (6.93)	0.13
Colesterol HDL	62.74 (1.89)	64.72 (2.61)	0.54
Colesterol LDL	148.67 (4.45)	157.62 (5.97)	0.23
Triglicéridos	102.04 (6.68)	97.39 (8.38)	0.66
Ácido úrico	4.74 (0.18)	4.76 (0.17)	0.93
TSH	1.95 (0.14)	2.11 (0.18)	0.52
Ácido fólico	10.18 (0.7)	11.54 (2.20)	0.56
Vitamina B12	393.79 (23.75)	411.58 (21.72)	0.58
Albúmina	4.32 (0.07)	4.17 (0.04)	0.095

**EEM:** error estándar de la media

**TSH:** hormona estimulante del tiroides

**Tabla 9. Asociación de GLP1, GLP2, PYY y DPP4 (niveles postprandiales) con parámetros de remodelado óseo (niveles de ayuno) en casos y en controles. Análisis de regresión lineal**

	Controles (n= 43)		Casos (n= 43)	
	Coefficiente (EE)	Valor de p	Coefficiente (EE)	Valor de p
Variable dependiente: GLP1 (pg/mL)				
Osteocalcina (ng/mL)	- 0.123 (0.55)	0.82	0.070 (0.59)	0.905
PINP (ng/mL)	-0.699 (0.33)	0.043	-0.365 (0.21)	0.098
CTX (ng/mL)	58.59 (29.49)	0.054	49.27 (18.33)	0.011
Variable dependiente: GLP2 (pg/mL)				
Osteocalcina (ng/mL)	5.74 (2.69)	0.04	-2.53 (3.51)	0.476
PINP (ng/mL)	-3.03 (2.69)	0.07	1.42 (1.29)	0.277
CTX (ng/mL)	- 80.30 (143.67)	0.579	-89.95 (109.9)	0.621
Variable dependiente PYY (pg/ml)				
Osteocalcina (ng/mL)	-0.0004 (0.003)	0.904	-0.0103(0.006)	0.113
PINP (ng/mL)	0.0017 (0.002)	0.394	0.004 (0.0025)	0.148
CTX (ng/mL)	-0.095 (0.182)	0.603	-0.095 (0.189)	0.621
Variable dependiente DPP4 (pg/mL)				
Osteocalcina (ng/mL)	-69.93 (41.9)	0.104	-15.16 (47.55)	0.752
PINP (ng/mL)	99.19 (25.3)	<0.001	15.21 (17.46)	0.389
CTX (ng/mL)	-534.2 (2237.6)	0.022	1689.03 (1486.4)	0.263

**EE:** error estándar

**PINP:** propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1

**CTX:** telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1

**GLP1:** *glucagon-like peptide 1*

**GLP2:** *glucagon-like peptide 2*

**PYY:** péptido tirosina-tirosina

**DPP4:** actividad enzima dipeptidil peptidasa 4

**Tabla 10. Asociación de GLP1 con los principales grupos de alimentos. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de <i>p</i>
Verdura total	0.004 (0.004)	0.34
Fruta total	0.002 (0.003)	0.44
Legumbres	0.005 (0.06)	0.92
Cereales	-0.02 (0.01)	0.23
Cereales integrales	-0.11 (0.03)	0.004
Lácteos	-0.007 (0.007)	0.36
Yogur	-0.03 (0.01)	0.091
Cárnicos	0.005 (0.01)	0.72
Embutidos	-0.14 (0.18)	0.44
Aceite de oliva	0.12 (0.09)	0.2
Pescado	0.01 (0.01)	0.41

**EE:** error estándar

**Tabla 11. Asociación de GLP1 con los macro y micronutrientes. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de p
Carbohidratos	-0.05 (0.03)	0.07
Fibra total	-0.12 (0.12)	0.31
Proteínas	0.02 (0.05)	0.66
Grasa total	0.12 (0.65)	0.07
Monoinsaturado	0.21 (0.11)	0.07
Poliinsaturados	-0.08 (0.3)	0.77
Saturados	0.18 (0.11)	0.11
AG. Trans	2.43 (2,85)	0.39
AGP N6	-0.07 (0.31)	0.81
AGP N3 no marinos	-0.67 (1.81)	0.71
AGP N3 marinos	1.95 (2.74)	0.47
Colesterol	0.01 (0.008)	0.24
Carga glicémica	-0.07 (0.04)	0.09
Vitamina A	0.002 (0.001)	0.07
Vitamina D	0.25 (0.38)	0.51
Vitamina E	0.47 (0.45)	0.29
Vitamina C	0.004 (0.01)	0.69
Hierro	0.12 (0.31)	0.68
Sodio	0.002 (0.002)	0.23
Magnesio	-0.009 (0.01)	0.51
Calcio	-0.0005 (0.003)	0.86
Fósforo	0.00004 (0.003)	0.99
Potasio	-0.66 (6.34)	0.91
Yodo	-0.004 (0.01)	0.67
Selenio	-0.01 (0.05)	0.72
Zinc	-0.58 (0.72)	0.42

EE: error estándar

**AG trans:** ácidos grasos transaturados

**AGP N6:** ácidos grasos omega 6

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 no marinos

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 marinos

**Tabla 12. Asociación de GLP2 con los principales grupos de alimentos. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de <i>p</i>
Verdura total	-0.01 (0.02)	0.56
Fruta total	-0.003 (0.01)	0.85
Legumbres	-0.15 (0.31)	0.62
Cereales	0.01 (0.1)	0.88
Cereales integrales	-0.0003 (0.2)	0.99
Lácteos	-0.06 (0.03)	0.09
Yogur	-0.13 (0.09)	0.16
Cárnicos	0.11 (0.08)	0.18
Embutidos	-0.25 (0.96)	0.79
Aceite de oliva	0.88 (0.49)	0.08
Pescado	0.02 (0.09)	0.78

**EE:** error estándar

**Tabla 13. Asociación de GLP2 con los macro y micronutrientes. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de p
Carbohidratos	-0.29 (0.14)	0.04
Fibra total	-0.71 (0.62)	0.26
Proteínas	0.08 (0.31)	0.77
Grasa total	0.62 (0.33)	0.06
Monoinsaturado	1.53 (0.58)	0.01
Poliinsaturados	0.35 (1.54)	0.82
Saturados	0.49 (0.61)	0.42
AG. Trans	6.08 (14.68)	0.68
AGP N6	-0.002 (1.64)	0.99
AGP N3 no marinos	-7.22 (9.28)	0.43
AGP N3 marinos	7.77 (14.07)	0.58
Colesterol	0.06 (0.04)	0.16
Carga glicémica	-0.34 (0.23)	0.14
Vitamina A	0.004 (0.006)	0.46
Vitamina D	0.52 (1.96)	0.78
Vitamina E	2.73 (2.31)	0.24
Vitamina C	-0.03 (0.06)	0.54
Hierro	-1.08 (1.59)	0.5
Sodio	-0.009 (0.01)	0.41
Magnesio	-0.04 (0.07)	0.58
Calcio	-0.02 (0.01)	0.17
Fósforo	-0.02(0.01)	0.18
Potasio	16.65 (32.54)	0.61
Yodo	-0.08 (0.05)	0.12
Selenio	0.02 (0.27)	0.93
Zinc	-0.004 (3.70)	0.99

EE: error estándar

**AG trans:** ácidos grasos transaturados

**AGP N6:** ácidos grasos omega 6

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 no marinos

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 marinos

**Tabla 14. Asociación de PYY con los principales grupos de alimentos. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de <i>p</i>
Verdura total	0.00001 (0.00003)	0.58
Fruta total	-0.00002 (0.00002)	0.43
Legumbres	0.0001 (0.0004)	0.7
Cereales	-6.75 e-06 (0.0001)	0.96
Cereales integrales	-0.0001 (0.0003)	0.62
Lácteos	0.00006 (0.00005)	0.29
Yogur	-0.00006 (0.0001)	0.65
Cárnicos	0.00004 (0.0001)	0.76
Embutidos	-0.002 (0.001)	0.08
Aceite de oliva	-0.002 (0.0006)	0.004
Pescado	0.0001 (0.0001)	0.29

**EE:** error estándar

**Tabla 15. Asociación del PYY con los macro y micronutrientes. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de p
Carbohidratos	0.00002 (0.0002)	0.89
Fibra total	0.0003 (0.0008)	0.71
Proteínas	0.0002 (0.0004)	0.53
Grasa total	-0.0008 (0.0004)	0.09
Monoinsaturado	-0.002 (0.0008)	0.02
Poliinsaturados	-0.0001 (0.002)	0.95
Saturados	-0.003 (0.0008)	0.65
AG. Trans	-0.01 (0.02)	0.54
AGP N6	-0.001 (0.002)	0.55
AGP N3 no marinos	0.007 (0.01)	0.56
AGP N3 marinos	0.02 (0.02)	0.3
Colesterol	2.64 e-06 (0.00006)	0.96
Carga glicémica	-0.0001 (0.0003)	0.75
Vitamina A	-6.09 e-06 (9.42 e-06)	0.52
Vitamina D	0.002 (0.002)	0.41
Vitamina E	-0.001 (0.003)	0.67
Vitamina C	0.00004 (0.00008)	0.64
Hierro	0.001 (0.002)	0.65
Sodio	-0.00001 (0.00001)	0.49
Magnesio	0.00004 (0.0001)	0.66
Calcio	-6.87 e-06 (0.00002)	0.78
Fósforo	8.77 e-06 (0.00002)	0.72
Potasio	-0.03 (0.05)	0.51
Yodo	0.0001 (0.00007)	0.057
Selenio	0.0002 (0.0004)	0.52
Zinc	-0.0008 (0.005)	0.86

EE: error estándar

**AG trans:** ácidos grasos transaturados

**AGP N6:** ácidos grasos omega 6

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 no marinos

**AGP N3 no marinos:** ácidos grasos omega 3 marinos



**Tabla 16. Asociación de la DPP4 con los principales grupos de alimentos. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de p
Verdura total	0.35 (0.36)	0.33
Fruta total	0.25 (0.25)	0.33
Legumbres	4.16 (4.73)	0.38
Cereales	-1.24 (1.55)	0.42
Cereales integrales	2.204 (3.13)	0.48
Lácteos	0.34 (0.61)	0.57
Yogur	-1.25 (1.51)	0.41
Cárnicos	0.86 (1.31)	0.51
Embutidos	-27.01 (14.55)	0.067
Aceite de oliva	4.85 (7.79)	0.53
Pescado	-0.04 (1.42)	0.97

**EE:** error estándar

**Tabla 17. Asociación de la DPP4 con los macro y micronutrientes. Análisis de regresión lineal**

Variable	Coefficiente (EE)	Valor de p
Carbohidratos	1.63 (2.23)	0.46
Fibra total	10.86 (9.61)	0.26
Proteínas	5.17 (4.69)	0.27
Grasa total	-7.08 (5.23)	0.18
Monoinsaturado	-7.14 (9.29)	0.44
Poliinsaturados	-55.72 (22.96)	0.018
Saturados	0.85 (9.38)	0.92
AG. Trans	347.42 (223.03)	0.12
AGP N6	-50.68 (24.62)	0.043
AGP N3 no marinos	-113.58 (143.02)	0.43
AGP N3 marinos	-120.38 (216.86)	0.58
Colesterol	0.92 (0.67)	0.17
Carga glicémica	2.24 (3.68)	0.54
Vitamina A	0.15 (0.103)	0.14
Vitamina D	-4.92 (30.31)	0.87
Vitamina E	-6.59 (35.93)	0.85
Vitamina C	1.82 (0.91)	0.048
Hierro	27.18 (24.42)	0.26
Sodio	-0.29 (0.17)	0.086
Magnesio	0.99 (1.14)	0.39
Calcio	0.33 (0.26)	0.22
Fósforo	0.39 (0.26)	0.14
Potasio	0.21 (500.43)	1.0
Yodo	1.103 (0.81)	0.17
Selenio	0.82 (4.27)	0.84
Zinc	27.24 (57.02)	0.63

EE: error estándar

AG trans: ácidos grasos transaturados

AGP N6: ácidos grasos omega 6

AGP N3 no marinos: ácidos grasos omega 3 no marinos

AGP N3 no marinos: ácidos grasos omega 3 marinos

**Tabla 18. Relación de las principales variables con osteoporosis. Análisis de regresión logística**

Variable	Análisis crudo		Análisis ajustado <sup>1</sup>	
	OR (95% CI)	Valor de p	OR (95 %CI)	Valor de p
GLP1 (por 10) (pg/mL)	0.724 (0.53-0.97)	0.031	0.603 (0.38-0.94)	0.027
GLP2 (por 100) (pg/mL)	1.03 (0.55-1.96)	0.912	0.99 (0.30-3.23)	0.988
PYY (pg/mL)	0.05 (0.0006-3.049)	0.150	0.291 (0.0004-16600)	0.715
DPP4 (por 1000) (pmol/min/ml)	1.06 (0.71-1.57)	0.766	0.89 (0.42-1.90)	0.775
Calcio corregido (mg/dL)	2.03 (0.42-9.89)	0.380	3.47 (0.20-59.1)	0.389
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	1.01 (0.03)	0.635	1.01 (0.9-1.13)	0.807
Osteocalcina (ng/mL)	1.1 (1.02-1.19)	0.017	1.05 (0.90-1.23)	0.505
PINP (ng/mL)	1.05 (1.01-1.08)	0.005	1.02 (0.96-1.07)	0.486
CTX (ng/mL)	562.4 (12.93- 24461)	0.001	297.98 (4.32-20531)	0.008
Ingesta Energía (kcal/día)	0.99 (0.99-1.00)	0.718	0.99 (0.99-1.00)	0.723
Ingesta Proteica (g/día)	1.00 (0.99-1.00)	0.949	1.00 (0.99-1.01)	0.618
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0.73 (0.59-0.88)	0.002	0.75 (0.61-0.91)	0.005

<sup>1</sup>Ajustado para IMC y CTX

**OR:** odds ratio

**GLP1:** glucagon-like peptide 1

**GLP2:** glucagon-like peptide 2

**PYY:** péptido tirosina-tirosina

**DPP4:** actividad enzima dipeptidil peptidasa 4

**PINP:** propéptido aminoterminal del procólgeno tipo 1

**CTX:** telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1

**IMC:** índice de masa corporal

## **X. ANEXO 1. Publicación asociada a esta tesis**

Montes Castillo, M.C., Martínez Ramírez, M.J., Soriano Arroyo, R., Prieto Gómez, I., Segarra Robles, A.B., Garrido Martínez, M., Santiago Fernández, P., Delgado Rodríguez, M. Glucagon-like peptide 1 and Glucagon-like peptide 2 in relation to osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women. Scientific reports (2019) 9:13651.

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-50117-z>

OPEN

# Glucagon-like peptide 1 and Glucagon-like peptide 2 in relation to osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women

María Cristina Montes Castillo <sup>1,7</sup>, María José Martínez Ramírez <sup>1,2</sup>, Rubén Soriano Arroyo <sup>1,8</sup>, Isabel Prieto Gomez <sup>3</sup>, Ana Belén Segarra Robles <sup>3</sup>, Macarena Garrido-Martínez <sup>4</sup>, Piedad Santiago-Fernández <sup>1</sup> & Miguel Delgado Rodríguez <sup>5,6</sup>

Osteoporosis results from an imbalance in bone remodeling, which is known to follow a circadian rhythm determined by a functional relationship between intestine and bone tissue. Specific intestinal peptides have been identified as mediators. Glucagon-like peptide 1 and glucagon-like peptide 2, have been associated with bone health. Our main objective was to determine whether postprandial plasma levels of glucagon-like peptide 1, glucagon-like peptide 2 and dipeptidyl-peptidase 4 activity, are associated with osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women. We studied non-diabetic postmenopausal women with osteoporosis diagnosed by dual-energy X-ray absorptiometry (cases,  $n = 43$ ) and age-matched ( $\pm 1$  yr) controls without osteoporosis or a history of osteoporotic fracture ( $n = 43$ ). We measured postprandial plasma levels of glucagon-like peptide 1, glucagon-like peptide 2, and dipeptidyl-peptidase 4 activity, bone mineral density, and baseline levels of bone remodeling markers and analyzed the food intake using a food-frequency questionnaire. Postprandial glucagon-like peptide 1 values were lower ( $p < 0.001$ ) in cases,  $\mu$  (SEM) = 116.25 (2.68), than in controls,  $\mu$  (SEM) = 126.79 (2.68). Glucagon-like peptide 1 was associated with reduced osteoporosis risk in the crude logistic regression analysis [OR (95% CI) = 0.724 (0.53–0.97),  $p = 0.031$ ] and adjusted analysis [OR = 0.603 (0.38–0.94),  $p = 0.027$ ]. We found no association of glucagon-like peptide 2, or dipeptidyl-peptidase 4 activity with osteoporosis. Postprandial glucagon-like peptide 1 levels are related to osteoporosis and osteoporosis risk in non-diabetic postmenopausal women. Further studies are required to verify these findings.

Glucagon-like peptide 1 (GLP1) and glucagon-like peptide 2 (GLP2) are intestinal peptides produced in the digestive system that participate in regulating the different stages of digestion. These peptides have attracted increased research interest in recent years, mainly on GLP1 in relation to glucose metabolism and diabetes mellitus<sup>1,2</sup> but also on their involvement in other intermediary metabolism pathways, including their effects at bone tissue level and their possible relationship with osteoporosis<sup>3,4</sup>.

Osteoporosis is characterized by bone mass reduction and microarchitecture impairment due to an imbalance in bone remodeling (BR) between bone formation and resorption, increasing the risk of fractures<sup>5</sup>. Under normal circumstances, resorption and formation processes are closely matched to avoid net changes in bone mass<sup>5</sup>.

BR follows a circadian rhythm, with BR markers increasing at night and decreasing during the day, most strongly influencing affecting the resorption mechanism<sup>4</sup>. No relationship has been found between this circadian

<sup>1</sup>Endocrinology and Nutrition, Jaen University Hospital, Av. Ejército Español, sn, Jaén, Spain. <sup>2</sup>Department of Health Sciences, University of Jaen, Campus "Las Lagunillas", Building B3, Jaén, Spain. <sup>3</sup>Area of Physiology, University of Jaen, Campus "Las Lagunillas", Building B3, Jaén, Spain. <sup>4</sup>University of Granada, School of Dentistry, Campus "La Cartuja", Granada, Spain. <sup>5</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Jaen, Campus "Las Lagunillas", Building B3, Jaén, Spain. <sup>6</sup>CIBERESP, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain. <sup>7</sup>Present address: Endocrinology and Nutrition, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. <sup>8</sup>Present address: Emergency Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C.M. (email: [cristinamontescastillo86@gmail.com](mailto:cristinamontescastillo86@gmail.com))

variation in bone remodeling and the secretion of cortisol, parathormone<sup>6</sup>, or melatonin<sup>7</sup>. It has been proposed that the BR circadian rhythm is influenced by food intake variations. Thus, the rhythm of remodeling is affected by food intake and increases during nocturnal fasting, which mainly affects bone resorption<sup>8,9</sup> rather than bone formation<sup>10</sup>, and bone resorption was found to be reduced by day-time food intake and increased by nocturnal fasting<sup>11</sup> independently of age, sex, or menopausal status<sup>12</sup>. It has also been observed that the bone resorption response to glucose is much greater when administered orally *versus* intravenously<sup>13</sup>. Taken together, these data indicate a functional relationship between intestine and bone metabolism that may possibly be mediated by hormones responding to nutrient absorption<sup>14,15</sup>.

Intestinal peptides have been described as key effectors of the acute response of bone metabolism to food consumption<sup>9</sup>. Preliminary data suggest that various intestinal peptides exert positive effects on bone resorption in response to food intake<sup>16</sup>.

A few minutes after food intake, GLP1 and GLP2 are segregated by endocrine L cells distributed throughout the intestinal tract, mainly in the ileum, and reach elevated levels from 30 min after intake<sup>13</sup>. GLP1 is part of the incretin system, which mainly comprises intestinal peptides associated with increased insulin secretion in response to food intake<sup>1</sup>. Other molecules of interest include receptor analogs similar to glucagon-like peptide (GLP1-RA), and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), the enzyme responsible for their metabolism<sup>17,1</sup>. GLP2, which has no incretin effect, acts in the intestine to stimulate mucosal trophism and favor nutrient absorption<sup>3</sup>, and its potential involvement in bone tissue is under investigation<sup>16</sup>.

The action of GLP1 on bone tissue has mainly been investigated in experimental studies. Administration of GLP1 and its receptor-stimulating analog, exendin, was found to reverse bone mass loss in rats<sup>18</sup>, and a later study in rodents observed that exendin favors bone formation and reduces bone resorption<sup>19</sup>. More recently, Meng *et al.* showed that peptide receptor similar to glucagon-1 (GLP1-R) activation improves osteoporosis and promotes osteogenic differentiation into bone marrow stromal cells in an animal model of osteoporosis (tail-suspended rats)<sup>20</sup>.

Studies in diabetic patients have demonstrated that various incretin-effect drugs used in diabetes mellitus may affect bone health. It has also been reported that both GLP1-RA<sup>21,22</sup> and DPP4 inhibitors<sup>23</sup> may affect the risk of fracture, although findings have been inconclusive. In addition, a recent meta-analysis associated the administration of liraglutide or lixisenatide with a decreased risk of bone fracture in patients with type 2 diabetes mellitus<sup>24</sup>.

The relationship of GLP2 with bone health has been studied in humans, finding that the intake of mixed food causes a reduction in bone resorption and an associated increase in GLP2 and that GLP2 treatment significantly reduces bone resorption<sup>8,15</sup> and improves bone mass<sup>10</sup>.

Although a relationship has been demonstrated between DPP4 and osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women<sup>25,26</sup> there is little evidence on the association of GLP1 with osteoporosis in humans with no glucose metabolism disorder. Confirmation of this relationship would be of interest, especially in relation to GLP1, because drugs based on these peptides are used in diabetes mellitus and may be of potential value in the treatment of osteoporosis. Therefore, the main objective of this study was to determine whether GLP1 and also GLP2 and the enzyme responsible for metabolism, DPP4, are related to the presence of osteoporosis diagnosed according to bone mass criteria in non-diabetic postmenopausal women.

## Methods

**Study design.** We conducted a case-control study with non-diabetic postmenopausal women with and without osteoporosis, matched 1:1 by age ( $\pm 1$  yr.).

We estimated a sample size of 38 patients per group based on the next statistical assumptions: needed to detect a significant difference (alfa error of 5%) between two means (106.3 vs. 92.2) with a common standard deviation of 12 based on the paper by Wojcik *et al.*<sup>27</sup> and a statistical power of 90%. Finally, we enrolled 86 women: 43 cases and 43 controls. Cases were women diagnosed with osteoporosis and controls were women without osteoporosis or a history of fracture.

We recruited volunteers from among patients who attended outpatient clinics of different specialties at our hospital between January 2015 to January 2016 and who met study eligibility criteria (see below).

Inclusion criteria for cases were: (1) female with age <70 yrs, (2) diagnosis by bone mass measurement with dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) of osteoporosis, defined by bone mineral density (BMD) T score value  $\leq -2.5$  standard deviations measured at femoral or lumbar sites; (3) absence of diabetes mellitus or pre-diabetes status (based on glycosylated hemoglobin and baseline fasting glycemia according to the criteria of the American Diabetes Association)<sup>28</sup>; and (4) postmenopausal status, defined by the presence of amenorrhea for more than one year.

Exclusion criteria were: (1) diagnosis of secondary osteoporosis<sup>29</sup>; (2) presence of any endocrinal disease and/or food behavior disorder; (3) pregnancy; (4) hospitalization during the previous six months; (5) diagnosis of severe cancer; (6) diagnosis of ileocolic disease (inflammatory bowel disease, intestinal malabsorption, or intestinal resection or fistulae); (7) diagnosis of stage IV chronic kidney disease: Modification of diet in renal disease-4 (MDRD-4) measured glomerular filtration rate (GFR) <30 mL/min/1.73 m<sup>2,30</sup>; (8) active treatment with: biological factors; anti-diabetic drug, including DPP4 inhibitors, or GLP-1 or GLP-2 analogs; cholestyramine; anticonvulsants; rifampicin; antacids; antineoplastic; corticoids; or anti-osteoporotic drugs.

Controls were age-matched ( $\pm 1$  yr.) non-diabetic postmenopausal women with DEXA-confirmed absence of osteoporosis and no history of low-energy fracture. Other exclusion criteria were the same as for cases.

We gathered data on: the participants' history of disease and drug consumption; their dietary intake, using a semi-quantitative food frequency questionnaire adapted to the Spanish population<sup>31</sup>; and their weight (kg), height (cm), and body mass index (BMI) (Kg/m<sup>2</sup>).

**Bone mass determination.** All participants underwent densitometry with LUNAR DPX GE HC densitometer in lumbar spine (vertebras L1-L4) and left femoral neck. We determined the T-scores and Z-scores, considering osteoporosis as a function of T-score when BMD values were  $\leq -2.5$  standard deviations (T-score  $\leq -2.5$ ) measured at one or both sites.

**Analytical determinations.** A blood sample was drawn from the antecubital vein at baseline after  $>8$  h fasting for the measurement of bone metabolism and general biochemistry parameters<sup>32</sup>. A second sample was drawn on the same day at 30 min after<sup>13,33</sup> the intake by participants of the same complete and chemically defined nutritional preparation of carbohydrates, proteins, and lipids (Resource HP/HC, NESTLE HEALTH SCIENCE) (see supplementary information) for peptide and DPP4 activity determinations, because intestinal peptide levels are very low under fasting conditions.

**Bone metabolism determination and general biochemistry parameters.** The following metabolism and BR parameters were analyzed in the hospital laboratory after  $>8$  h fasting<sup>32</sup>: plasma calcium and phosphorus (mg/dL), 25-OH vitamin D (ng/mL), intact parathyroid hormone (PTHi) (pg/mL), osteocalcin (ng/mL), procollagen type I aminoterminal propeptide (PINP) (ng/mL), and type I collagen C-terminal telopeptide (CTX) (ng/mL), and usual biochemical values, including glycosylated hemoglobin (%), basal glucose (mg/dL), and serum albumin (g/dL).

**GLP1 and GLP2 determination.** GLP1 (pg/mL) and GLP2 (pg/mL) were measured in the physiology laboratory of the University of Jaen (Spain). Immediately before postprandial blood samples were drawn, 10  $\mu$ L/mL of a DPP4 inhibitor (DPP4/DPP4-010, Linco Research Inc, St Charles, Missouri, USA) were added to the tubes, following Hattori *et al.*<sup>34</sup>. Plasma samples were then obtained by placing the tubes in ice and immediately centrifuging them at 4 °C and 3,000  $\times$  g for 30 min followed by their storage at  $-80$  °C. Specific BIONOVA<sup>®</sup> commercial kits were used to determine total (cleaved and uncleaved) GLP-1 and GLP-2 levels using ELISA techniques.

**DPP4 activity determination.** DPP4 activity was determined at the above physiology laboratory in blood samples drawn at 30 min after consumption of the aforementioned nutritional preparation into tubes with no DPP4 inhibitor, using a fluorimetry assay (Sigma-Aldrich DPP4 Activity Assay Kit) based on hydrolysis by the enzyme of the H-Gly-Pro-4-methoxy- $\beta$ -naphthylamide substrate, which releases  $\beta$ -naphthylamide, measuring its fluorescence at 345 nm excitation and 412 nm emission wavelengths after incubation at 37 °C. Values were expressed as pmol of  $\beta$ -naphthylamine released per minute of incubation and per mL of plasma.

**Statistical analysis.** The Student's t-test was used to compare means between cases and controls. Linear regression analysis was performed to evaluate the prediction by bone remodeling parameters of peptide levels separately in cases and controls. Conditional logistic regression analysis was used to assess associations between the different peptides and osteoporosis, adjusting for potential confounders. Program Stata 14 SE (College Station, TX, US) was used for data analyses.

**Ethics statement.** All enrolled patients signed informed consent to participation in the study, which was approved by the Research Ethics Committee and followed all recommendations of the Helsinki Convention.

The study was approved by local ethical committee "Comité de Ética de la Investigación de Jaén", (date: 10-30-2014).

**Ethical approval.** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

**Informed consent.** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## Results

Table 1 lists results of the descriptive analysis. The mean age (SEM) was 58.74 (0.63) yrs for cases and 58.76 (0.63) yrs for controls. No statistically significant difference was found between cases and controls in mean age, history of disease or pharmacological treatment (data not shown in table), glycosylated hemoglobin, alcohol, tobacco consumption, or dietary intake (energy and macronutrients). Weight and BMI values were significantly lower ( $p < 0.001$ ) in cases than in controls.

Table 2 compares means values of blood variables between cases and controls, showing significantly lower ( $p < 0.001$ ) GLP1 levels in cases ( $\mu$  [SEM]) = 116.75 [2.68]) than in controls ( $\mu$  [SEM] = 126.79  $\pm$  2.68). No statistically significant between-group differences were found in plasma GLP2, DPP4, 25-OH vitamin D, PTHi, calcium (albumin-corrected), or phosphorus levels. As expected, cases and controls significantly differed ( $p < 0.001$ ) in densitometry and BR parameters (osteocalcin, PINP, and CTX).

Table 3 exhibits results of the linear regression analysis for GLP1, GLP2, and DPP4 levels and BR markers. We found a positive correlation between GLP1 and CTX that was significant in cases ( $p = 0.011$ ) and close to significant in controls ( $p = 0.054$ ), and a significant negative correlation between GLP1 and PINP in controls ( $p = 0.043$ ). GLP2 was also positively correlated with osteocalcin in controls ( $p = 0.04$ ). DPP4 was positively correlated with PINP ( $p < 0.001$ ) and CTX ( $p = 0.022$ ) in controls.

Table 4 displays results of the crude and adjusted conditional logistic regression analyses on the relationship with the presence of osteoporosis of intestinal peptides and DPP4, BR parameters, dietary intake, and BMI. GLP1 was associated with a significant reduction in osteoporosis risk after adjustment for BMI and CTX as confounders (OR [95% CI] = 0.724 [0.53–0.97]).

Variables	Controls (n = 43)	Cases (n = 43)	p value
Age (yrs), mean (SEM)	58.8 (0.6)	58.7 (0.6)	0.98
<b>Work situation, n (%)</b>			
Active	21 (48.8)	29 (67.4)	0.168
Retired or unemployed	5 (11.6)	5 (11.6)	
Housewife	17 (39.5)	9 (20.9)	
<b>Tobacco n (%)</b>			
No	35 (81.4)	33 (76.3)	0.702
<1–4 cigarettes/day	0 (0.0)	2 (4.7)	
5–10 cigarettes/day	3 (7.0)	3 (7.0)	
>10 cigarettes/day	4 (9.3)	4 (9.3)	
Not known/No response	1 (2.3)	1 (2.3)	
<b>Alcohol</b>			
No	37 (86.0)	32 (74.4)	0.152
Occasional	2 (4.7)	8 (18.6)	
<10 g day	3 (7.0)	3 (7.0)	
Energy (Kcal/d), mean (SEM)	2723 (217.90)	2604 (166.60)	0.665
Carbohydrates (g/d), mean (SEM)	295.5 (30.86)	263.3 (20.16)	0.387
Proteins (g/day), mean (SEM)	123.5 (8.89)	123.3 (11.0)	0.99
Total fat (g/day), mean (SEM)	114.1 (9.84)	111.5 (6.61)	0.832
Weight (Kg), mean (SEM)	75.06 (2.13)	63.39 (1.84)	<0.001
Height (cm), mean (SEM)	157.6 (0.84)	156.19 (1.21)	0.336
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ), mean (SEM)	30.29 (0.90)	26.04 (0.74)	<0.001
Glycosylated hemoglobin, mean (SEM)	5.53 (0.05)	5.51 (0.04)	0.85

**Table 1.** Descriptive analysis. BMI: body mass index.

Variable	Controls (n = 43)	Cases (n = 43)	p value
<b>Intestinal peptides</b>			
GLP1 (pg/mL)	126.79 (2.68)	116.75 (2.68)	<0.001
GLP2 (pg/mL)	308.91 (13.27)	310.49 (14.3)	0.933
DDP4 (pmol/min/mL)	7643.02 (223.2)	7711 (207.9)	0.822
<b>Bone remodeling markers</b>			
Albumin-corrected serum Ca (mg/dL)	9.26 (0.05)	9.31 (0.03)	0.373
Serum phosphorus (mg/dL)	3.24 (0.05)	3.36 (0.08)	0.234
25OHD (ng/mL)	18.63 (1.05)	19.3 (30)	0.652
PTH <sub>i</sub> (pg/mL)	58.51 (7.87)	47.88 (2.75)	0.206
Osteocalcin (ng/mL)	19.36 (1.07)	23.23 (1.11)	0.014
PINP (ng/mL)	39.04 (2.16)	51.24 (3.05)	0.001
CTX (ng/mL)	0.322 (0.02)	0.481 (0.03)	<0.001
<b>Bone mass</b>			
Lumbar spine t-score	0.185 (0.10)	−2.823 (0.10)	<0.001
Lumbar spine z-score	1.274 (0.11)	−1.344 (0.14)	<0.001
Femur t-score	0.302 (0.12)	−1.92 (0.13)	<0.001
Femur z-score	0.89 (0.11)	−1.11 (0.13)	<0.001

**Table 2.** Comparison of means of main variables between cases and controls. GLP1: Glucagon-like 1. GLP2: Glucagon-like 2. DPP4: dipeptidyl peptidase 4 activity. 25OHD: 25-OH vitamin D. CTX: Type I collagen C-terminal telopeptide. PINP: Type I collagen I N-terminal propeptide. BMI: body mass index.

## Discussion

The main finding of this study was the association between plasma GLP1 levels and osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women. Postprandial GLP1 values were significantly lower in non-diabetic postmenopausal women with than without osteoporosis, and higher values were significantly associated with a reduction in osteoporosis risk in the crude and adjusted logistic regression analyses. The presence or risk of osteoporosis was not associated with GLP2 levels or DPP4 activity.

The existence of a relationship between bone tissue and intestinal peptides was also supported by the following findings: (1) a positive correlation of GLP1 with the BR marker CTX that was significant in cases and close to significant in controls, and a negative correlation of GLP1 with PINP in controls; (2) a positive and significant



	Controls (n = 43)		Cases (n = 43)	
	$\beta$ coefficient (SE)	p value	$\beta$ Coefficient (SE)	p value
<b>Dependent variable: GLP1 (pg/mL)</b>				
Osteocalcin (ng/mL)	-0.123 (0.55)	0.82	0.070 (0.59)	0.905
PINP (ng/mL)	-0.699 (0.33)	0.043	-0.365 (0.21)	0.098
CTX (ng/mL)	58.59 (29.49)	0.054	49.27 (18.33)	0.011
<b>Dependent variable: GLP2 (pg/mL)</b>				
Osteocalcin (ng/mL)	5.74 (2.69)	0.04	-2.53 (3.51)	0.476
PINP (ng/mL)	-3.03 (2.69)	0.07	1.42 (1.29)	0.277
CTX (ng/mL)	-80.30 (143.67)	0.579	-89.95 (109.9)	0.621
<b>Dependent variable DPP4 (pg/mL)</b>				
Osteocalcin (ng/mL)	-69.93 (41.9)	0.104	-15.16 (47.55)	0.752
PINP (ng/mL)	99.19 (25.3)	<0.001	15.21 (17.46)	0.389
CTX (ng/mL)	-534.2 (2237.6)	0.022	1689.03 (1486.4)	0.263

**Table 3.** Association of GLP1, GLP2, DPP4 (postprandial levels) with bone remodeling parameters (fasting levels) in cases and in controls. *SE* (Standard Error). Linear regression analysis.

Variable	Crude analysis		Adjusted analysis <sup>a</sup>	
	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
GLP1 (per 10) (pg/mL)	0.724 (0.53–0.97)	0.031	0.603 (0.38–0.94)	0.027
GLP2 (per 100) (pg/mL)	1.03 (0.55–1.96)	0.912	0.99 (0.30–3.23)	0.988
DPP4 (per 1000) (pmol/min/ml)	1.06 (0.71–1.57)	0.766	0.89 (0.42–1.90)	0.775
Albumin-corrected calcium (mg/dL)	2.03 (0.42–9.89)	0.380	3.47 (0.20–59.1)	0.389
25OHD (ng/mL)	1.01 (0.03)	0.635	1.01 (0.9–1.13)	0.807
Osteocalcin (ng/mL)	1.1 (1.02–1.19)	0.017	1.05 (0.90–1.23)	0.505
PINP (ng/mL)	1.05 (1.01–1.08)	0.005	1.02 (0.96–1.07)	0.486
CTX (ng/mL)	562.4 (12.93–24461)	0.001	297.98 (4.32–20531)	0.008
Energy intake (Kcal/day)	0.99 (0.99–1.00)	0.718	0.99 (0.99–1.00)	0.723
Protein intake (g/day)	1.00 (0.99–1.00)	0.949	1.00 (0.99–1.01)	0.618
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	0.73 (0.59–0.88)	0.002	0.75 (0.61–0.91)	0.005

**Table 4.** Relationship of main variables with osteoporosis. <sup>a</sup>Adjusted for BMI and CTX. Logistic regression analysis.

association of GLP2 with osteocalcin in controls; and (3) a positive association of DPP4 activity with PINP and its negative association with CTX in controls.

The main study limitation is that we performed only one analytical determination of peptides and other bone metabolism markers. Besides the results obtained for GLP1, a strength of this study is that it appears to be the first to compare postprandial levels of GLP1 and GLP2 peptides between non-diabetic postmenopausal women with and without osteoporosis.

Our results for GLP1 are conclusive, observing a clear association with osteoporosis in the comparison of means and in the conditional logistic regression. The association between GLP1 and bone tissue was previously evidenced in preclinical studies.

GLP-1 must bind with its receptor to exert its metabolic effects<sup>14</sup> and is rapidly inactivated by enzyme DPP4, resulting in inactive GLP1<sub>9–36</sub> with low affinity for GLP1-R<sup>35</sup>. GLP1-R has been detected in pancreatic islets, lung, stomach, kidney, hypothalamus, and heart but not in liver, adipose tissue, or skeletal muscle<sup>35</sup>, although Nuche-Berenguer *et al.* reported that GLP1 can act directly on cultured osteoblasts (MC3T3-E1 osteoblastic cells) *via* a membrane receptor<sup>36</sup>. In addition, Pacheco-Pantoja *et al.* (2011) observed the expression of GLP1-R in different human osteoblast cell lines and demonstrated their influence on the secretion of osteocalcin, alkaline phosphatase, and PINP<sup>37</sup>.

The molecular mechanisms underlying the effects of GLP1 on bone tissue have not yet been elucidated. GLP1 or GLP1-RA may act directly on bone *via* functional GLP1-R expressed by bone cells<sup>36,37</sup> or indirectly through an increased production of calcitonin by thyroid C cells, inhibiting bone resorption<sup>38</sup>.

The action of GLP1 and GLP1-RA on bone tissue has been investigated in animal and *in vitro* studies. GLP1-R knockout mice showed densitometry-measured osteopenia and bone fragility and increased bone histomorphometry-evaluated resorption and osteoclastic activity<sup>39</sup>. In another study<sup>40</sup>, GLP1-R *knockout* mice evidenced significantly reduced bone strength, rigidity, and quality in comparison to *wild-type* mice, with a less mature collagen matrix and inferior intrinsic bone properties, although no statistically significant difference in bone mineral quantity was observed; the authors described GLP1-R as likely responsible for bone tissue resistance and quality<sup>40</sup>.

In 2011, Nuche-Berenguer *et al.* reported that the administration of GLP1 and exendin (receptor analog) improved lipid and glucose metabolism and increased the expression of genes encoding osteocalcin and

osteoprotegerin, reversing bone mass loss<sup>18</sup>. Ma *et al.* observed that exendin administration in ovariectomized rats exerted a protective effect against osteoporosis, modulating the balance between bone resorption and formation<sup>19</sup>. More recently, exendin was found to have an anabolic effect on bone tissue, suggesting that GLP1-R participates in bone marrow stromal cell differentiation into osteoblasts<sup>20</sup>.

Our study confirms that GLP1 is related to osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women, finding a lower release of GLP1 in response to food in cases than in controls and observing that GLP1 was associated with a significant reduction of around 27% in osteoporosis risk.

However, our findings on the relationship between GLP1 and BR markers were unexpected. We found that GLP1 was positively associated in cases with CTX, a bone resorption parameter, and was negatively associated in controls with PINP, a bone formation parameter. A recent study of overweight/obese men reported that GLP1 and gastric inhibitory polypeptide (GIP) reduced their CTX levels and that the co-infusion of both peptides had a synergistic effect on their CTX levels and bone resorption<sup>41</sup>. In another investigation, obese women who had lost weight after following a hypocaloric diet were four-fold less likely to lose bone mass if treated with liraglutide, showing an increase in PINP but no change in CTX in comparison to the women not treated with this GLP1 analog<sup>42</sup>.

The discrepancy between these results may have various explanations: (1) our main objective was to associate GLP1 with osteoporosis, not directly with BR markers; (2) postmenopausal osteoporosis is a bone disorder with intense BR<sup>43</sup>, increasing all BR markers, with a final predominance of bone resorption; and (3) we studied postprandial levels of peptides but fasting values of BR parameters, and GLP1 secretion likely changes in response to food intake. Furthermore, our results are in at least partial agreement with the study of Pacheco-Pantoja in osteoblast cell lines, which reported a reduction in PINP secretion after stimulation with GLP1<sup>37</sup>. In addition, a polymorphism in GLP1-R has been found to influence osteoporosis risk<sup>44</sup> and may cause a dissociated response of bone tissue to GLP1 and its analogs. A meta-analysis in 2013 reported that different GLP1 analogs had opposite effects on the risk of osteoporotic fracture<sup>45</sup>, and a more recent meta-analysis concluded that only two GLP1 analogs, liraglutide and lixisenatide, reduced bone fracture risk and that their effect depended on the treatment duration<sup>24</sup>.

As in the case of GLP1, GLP2 has been shown by various researchers to exert beneficial effects on bone tissue<sup>46</sup>. However, we found no association between GLP2 and osteoporosis, although we did observe a positive and significant association between GLP2 and osteocalcin in our control group. GLP1 and GLP2 are secreted in a 1:1 ratio by intestinal endocrine L cells, and a similar between-group difference in GLP-2 might therefore be expected<sup>33</sup>. Fasting plasma levels of the active forms of these peptides are 5–10 pM for GLP1 and 15–20 pM for GLP2, and these values can be 2- to 5-fold higher after intake, with GLP2 being more stable than GLP1<sup>33</sup>. These baseline differences may explain our finding of disparities in the levels of these peptides. Other studies have described a similar divergence in their values<sup>47,48</sup>.

The effects of GLP2 on bone tissue have been widely studied in humans. The underlying molecular mechanisms of its action have yet to be elucidated<sup>4</sup>, but the presence of peptide receptor similar to glucagon-2 has been proposed in some osteoblast cell lines that showed increased osteocalcin synthesis in response to GLP2<sup>37</sup>. In studies by Henriksen *et al.*, the intake of a mixture of nutrients by healthy volunteers reduced bone resorption and produced the parallel secretion of GLP1 and GLP2, and the intravenous injection of different doses of GLP2 in 60 postmenopausal women reduced bone resorption but had no effect on bone formation parameters<sup>15</sup>. In a later study by the same group, the administration of GLP2 for 14 days to healthy postmenopausal women was found to be a safe treatment that significantly reduced bone resorption and did not affect bone formation, with osteocalcin levels remaining stable<sup>8</sup>. A trial in which 160 postmenopausal women were treated with GLP2 described an increase in hip bone density and reduction in nocturnal CTX concentrations at day 120 post-injection, with no modification in osteocalcin<sup>49</sup>.

In contrast, we found a significant relationship of osteoporosis with GLP1 but not with GLP2, which may be attributable to the difference in their actions. The principal actions of GLP2 are at intestinal level (trophic effect and stimulation of intestinal absorption), and its receptors are mainly present at intestinal and brain level<sup>50,51</sup>, although their presence is suspected, with no clear evidence, in human bone tissue cells<sup>46</sup>. For its part, GLP1 exerts its actions at pancreatic level, mainly with incretin effect, and its receptors are present in a larger number of tissues<sup>33</sup> and in osteoblasts<sup>37</sup>, with direct effects on bone cells<sup>46</sup>.

Our observation that GLP2 was positively associated with osteocalcin in the women without osteoporosis is consistent with the increase in osteocalcin previously observed in post-menopausal women after the subcutaneous administration of GLP2 under fasting conditions<sup>52</sup> and also with the aforementioned report on increased osteocalcin in osteoblast cell lines after GLP2 treatment<sup>37</sup>.

In the present study, DPP4 activity did not differ between participants with *versus* without osteoporosis, while it was positively associated with PINP and negatively associated with CTX but only among those without osteoporosis. Kim *et al.* recently observed an association between DPP4 activity levels and osteoporotic fracture risk in non-diabetic postmenopausal women, finding that high levels were associated with elevated BR markers; the authors indicated that bone formation and resorption was influenced by certain DPP4 substrates<sup>25</sup>. Zheng *et al.* studied 744 postmenopausal women with no glucose metabolism disorder and found higher DPP4 activity in patients with osteoporosis and a positive association with osteocalcin and CTX. The discrepancy between these results may be attributable to differences in their sample sizes or to the determination of DPP4 activity after fasting by Zheng<sup>26</sup>.

In conclusion, postprandial GLP1 levels are significantly reduced in non-diabetic postmenopausal women with osteoporosis, and higher postprandial GLP1 levels are associated with reduced osteoporosis risk in this population. This study contributes new data on the relationship between osteoporosis and intestinal peptides in humans and verifies the association between GLP1 and osteoporosis in non-diabetic postmenopausal women. These results suggest that GLP1 analog molecules, currently prescribed for diabetes mellitus, may potentially represent an alternative therapeutic approach to osteoporosis. No association was observed between osteoporosis and GLP2 levels or DPP4 activity, and the relationship of GLP1, GLP2, and DPP4 with bone remodeling markers remains unclear. Further research is warranted on the links between intestinal peptides and bone tissue.

## References

- Drucker, D. J. & Nauck, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. **368**, 1696–1705 (2006).
- Luo, G., Liu, H. & Lu, H. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: Potential to reduce fracture risk in diabetic patients? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **81**, 78–88 (2016).
- Wong, I. P. L., Baldock, P. A. & Herzog, H. Gastrointestinal peptides and bone health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **17**, 44–50 (2010).
- Yavropoulou, M. P. & Yovos, J. G. Incretins and bone: Evolving concepts in nutrient-dependent regulation of bone turnover. *Hormones*. **12**, 214–223 (2013).
- Kanis, J. A. *et al.* European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* **24**, 23–57 (2013).
- Heshmati, H. M. *et al.* Effects of the circadian variation in serum cortisol on markers of bone turnover and calcium homeostasis in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* **83**, 751–756 (1998).
- Kotlarczyk, M. P. *et al.* Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): A randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. *J Pineal Res.* **52**, 414–426 (2012).
- Henriksen, D. B. *et al.* Disassociation of bone resorption and formation by GLP-2: a 14-day study in healthy postmenopausal women. *Bone*. **40**, 723–9 (2007).
- Walsh, J. S. & Henriksen, D. B. Feeding and bone. *Arch Biochem Biophys.* **503**, 11–9 (2010).
- Deal, C. Future therapeutic targets in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* **21**, 380–5 (2009).
- Bjarnason, N. H. *et al.* Mechanism of circadian variation in bone resorption. *Bone*. **30**, 307–313 (2002).
- Qvist, P. *et al.* Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTX): Effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone*. **31**, 57–61 (2002).
- Nauck, M. A. & Meier, J. J. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: Physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **4**, 525–536 (2016).
- Mabilleau, G., Pereira, M. & Chenu, C. Novel skeletal effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists. *J Endocrinol.* **236**, 29–42 (2017).
- Henriksen, D. B. *et al.* Role of Gastrointestinal Hormones in Postprandial Reduction of Bone Resorption. *J Bone Miner Res.* **18**, 2180–2189 (2003).
- Nauck, M. A. & Meier, J. J. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes, Obes. Metab.* **20**, 5–21 (2018).
- Dicembrini, I., Mannucci, E. & Rotella, C. M. Bone: incretin hormones perceiver or receiver?. *Exp Diabetes Res.* **201**, 519784 (2012).
- Nuche-Berenguer, B. *et al.* GLP-1 and exendin-4 can reverse hyperlipidic-related osteopenia. *J Endocrinol.* **209**, 203–210 (2011).
- Ma, X. *et al.* Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* **28**, 1641–1652 (2013).
- Meng, J. *et al.* Activation of GLP-1 Receptor Promotes Bone Marrow Stromal Cell Osteogenic Differentiation through  $\beta$ -Catenin. *Stem Cell Reports.* **6**, 579–591 (2016).
- Triessen, J. H. M. *et al.* Use of Glucagon-Like-Peptide 1 Receptor Agonists and Risk of Fracture as Compared to Use of Other Anti-hyperglycemic Drugs. *Calcif Tissue Int.* **97**, 506–515 (2015).
- Meier, C. *et al.* Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*. **82**, 93–100 (2016).
- Monami, M. *et al.* Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care.* **34**, 2474–2476 (2011).
- Cheng, L., *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of bone fracture in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Res Rev.* 1–11 (2019).
- Kim, H. *et al.* Association of circulating dipeptidyl-peptidase 4 levels with osteoporotic fracture in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* **28**, 1099–1108 (2017).
- Zheng, T. *et al.* Plasma DPP4 Activities Are Associated With Osteoporosis in Postmenopausal Women With Normal Glucose Tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* **100**, 3862–3870 (2015).
- Wojcik, M. H. *et al.* Reduced amylin levels are associated with low bone mineral density in women with anorexia nervosa. *Bone*. **46**, 796–800 (2010).
- American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care.* **41**, 13–27 (2018).
- Tarantino, U. *et al.* Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J Orthop Traumatol.* **18**, 3–36 (2017).
- Salvador-González, B. *et al.* Estimación del filtrado glomerular según MDRD-4 IDMS y CKD-EPI en individuos de edad igual o superior a 60 años en atención primaria. *Nefrología.* **33**, 552–563 (2013).
- Martínez-González, M. A. *et al.* Mediterranean diet and stroke: objectives and design of the SUN project. Seguimiento Universidad de Navarra. *Nutr Neurosci.* **5**, 65–73 (2002).
- Delmas, P. D. *et al.* The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int.* **11**, 2–17 (2000).
- Baggio, L. L. & Drucker, D. J. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **18**, 531–554 (2004).
- Hattori, A. *et al.* Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 1–9 (2013).
- Cantini, G., Mannucci, E. & Luconi, M. Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors. *Trends Endocrinol Metab.* **27**, 427–438 (2016).
- Nuche-Berenguer, B. *et al.* Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol.* **225**, 585–592 (2010).
- Pacheco-Pantoja, E. L. *et al.* Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol.* **11**, 1–14 (2011).
- Zhao, C. *et al.* The impact of glucagon-like peptide-1 on bone metabolism and its possible mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* **8**, 1–8 (2017).
- Yamada, C. *et al.* The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology.* **149**, 574–579 (2008).
- Mabilleau, G. *et al.* Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *J Endocrinol.* **219**, 59–68 (2013).
- Bergmann, N. C. *et al.* Separate and Combined Effects of GIP and GLP-1 Infusions on Bone Metabolism in Overweight Men without Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* **104**, 2953–2960 (2019).
- Iepson, E. W. *et al.* GLP-1 receptor agonist treatment increases bone formation and prevents bone loss in weight-reduced obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* **100**, 2909–2917 (2015).
- Garnero, P. *et al.* Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* **15**, 1526–1536 (2000).
- Fu, S. *et al.* Polymorphism of glucagon-like peptide-1 receptor gene (rs1042044) is associated with bone mineral density in Chinese Han postmenopausal women. *African J Biotechnol.* **14**, 714–718 (2015).

45. Su, B. *et al.* Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*. **48**, 107–115 (2015).
46. Schiellerup, S. P. *et al.* Gut Hormones and Their Effect on Bone Metabolism. Potential Drug Therapies in Future Osteoporosis Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **10**, 1–13 (2019).
47. Trautvetter, U. & Jahreis, G. Effect of supplementary calcium phosphate on plasma gastrointestinal hormones in a double-blind, placebo-controlled, cross-over human study. *Br J Nutr*. **111**, 287–293 (2014).
48. Mutanen, A. & Pakarinen, M. P. Serum fasting GLP-1 and GLP-2 associate with intestinal adaptation in pediatric onset intestinal failure. *Clin Nutr*. **36**, 1349–1354 (2017).
49. Henriksen, D. B. *et al.* Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD. A randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. *Bone*. **45**, 833–842 (2009).
50. Burrin, D. G. *et al.* Recent Advances in Nutritional Sciences Glucagon-Like Peptide 2: A Nutrient-Responsive Gut Growth. *J nutr*. **131**, 709–712 (2001).
51. Dong, C. X. *et al.* The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function. *Endocrinology*. **155**, 370–379 (2014).
52. Henriksen, D. B. *et al.* Reduction of nocturnal rise in bone resorption by subcutaneous GLP-2. *Bone*. **34**, 140–147 (2004).

## Acknowledgements

This study was funded by “Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)” (Madrid, Spain) and “Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)” (PI14/01591).

## Author Contributions

All authors have contributed: (1) the conception and design of the study (M.J.M.R., M.C.M.C., I.P.G., M.D.R.), acquisition of data (M.C.M.C., M.J.M.R., R.S.A., I.P.G., A.B.S.R., P.S.F., M.G.M.) or analysis and interpretation of data (M.J.M.R., M.C.M.C., P.S.F., M.D.R.), (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content (M.C.M.C., M.J.M.R., R.S.A., I.P.G., A.B.S.R., P.S.F., M.G.M., M.D.R.), (3) final approval of the version to be submitted (M.C.M.C., M.J.M.R., R.S.A., I.P.G., A.B.S.R., P.S.F., M.G.M., M.D.R.).

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50117-z>.

**Competing Interests:** María Cristina Montes Castillo declares that she has no conflict of interest. María José Martínez Ramírez declares that she has no conflict of interest. Rubén Soriano Arroyo declares that he has no conflict of interest. Isabel Prieto Gomez declares that she has no conflict of interest. Ana Belén Segarra Robles declares that she has no conflict of interest. Macarena Garrido-Martínez declares that she has no conflict of interest. Piedad Santiago-Fernández declares that she has no conflict of interest. Miguel Delgado Rodríguez declares that he has no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## **XI. ANEXO 2. Composición del preparado nutricional**

Composición nutricional del Resource HP/HC (*Nestlé Health Science* ®)

Un envase de 200 ml contiene:

- 1.6 kcal/ mL
- 320 kcal
- 20 g proteínas (P)
- 32 g carbohidratos (CHO)
- 12.4 g lípidos (L)
- Fibra dietética: 0 g (F)
- Distribución calórica: P/CHO/L/F: 25/40/35/0